Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

P 428

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

VOL. 4 (1)

1975

I. N. R. A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
25.OCT.1982
UNITE CENTRALE DE VERSAILLES

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine S^t Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-4

CONFIDENTIEL

I. N. R. A.

DEPARTEMENT DE ZOOLOGIE

RAPPORT SEMESTRIEL D' ACTIVITE DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

Vol. 4 (1)

28 JUIL. 1975
26 AOUT 1975

Sommaire

INTRODUCTION 1

Première partie : RAPPORT SCIENTIFIQUE.

I. Sur l'acide ascorbique et ses dérivés chez quelques insectes phytophages :

a) dégradation oxydative dans les milieux d'élevage 3

b) l'acide ascorbique chez les larves élevées sur milieux . . . 3

c) Détermination des paramètres d'oxydation in vitro . . . 8

d) Effets biochimiques de l'acide ascorbique et de l'acide déhydro-ascorbique chez *Laspereysia pomonella* . . . 8

II. Sur les protéines de l'hémolymphe chez l'Abeille :

a) Etudes quantitatives au cours du développement 12

b) comparaison de quelques races 13

c) Etude des hybrides 15

d) Projets 16

III. Sur les protéines de l'hémolymphe chez *Noctua pronuba* :

a) Classification des fractions 17

b) Comparaison du spectre protéique de 3 lignées 19

c) Projets 24

IV. Analyse des métabolites libres de l'hémolymphe de différents insectes.

① Méthodes d'Analyse : a) Micro chromatographie quantitative des glucides . . 25

b) " " " des ac. aminés . . 27

c) " " " des lipides . . . 27

d) Etude sur l'intégration des pics 28

② Résultats d'applications.

a) Glucides libres de l'hémolymphe au cours du développ.t de l'Abeille noire 33

b) Influence du nourrissement sur la glycémie de l'Abeille 34

c) Glucides libres dans le puceron *Myzus persicae* ... 36

d) Sucres dans les miels et miellats 39

V. Sur la régulation du fonctionnement des α-Glucosidases et de la Glycemie chez l'Abeille noire.

Sommaire du mémoire : 41

VI. Utilisation des iso-enzymes en génétique.

① Génétique de l'Abeille 122

② " " des Noctuelles 122

③ Projets 123

Deuxieme partie : RAPPORT ADMINISTRATIF et R. MORAL

I. BILAN BUDGÉTAIRE DU SEMESTRE : 1). Equipement 125

2) - Fonctionnement 126

3) - Prévisions (2e semestre) ... 127

II. RAPPORT MORAL ET PROSPECTIF.

1). A propos de la mission du Laboratoire de biochimie ... 128

2). les difficultés rencontrées 130

3). Formulations prospectives 132

...

CONCLUSION 134

Bibliographie du laboratoire pour le premier semestre 75 . . 135

Annexes :

Demandes d'Achat pour le 2e semestre 1975

(• Documentation : ouvrages -
• Matériel de laboratoire -
• Réactifs enzymologiques -
• Produits chimiques -)

Projet initial de Calendrier expérimental - (Rappel) -

INTRODUCTION

Le laboratoire de biochimie s'est constitué progressivement à partir du début de 1973, motivé par des objectifs précis avant même que soient rassemblés les premiers moyens matériels. Les méthodes de fortune ont assuré la liaison, et c'est pourquoi 1975 est déjà une année de transition avec au programme :

1°- Des travaux relativement anciens, au stade de la rédaction finale(*) :

- Acides Ascorbique et déhydroAscorbique chez quelques Lépidoptères phytophages
- Protéinémie chez l'Abeille noire (Publications sous presse).

2° Des travaux assez avancés ou en voie d'aboutissement (*) :

- Protéinémie comparée des races d'Abeilles, micro analyse quantitative des métabolites de l'hémolymphe de divers insectes, régulation de la glycémie et des α-gluco-sidases de l'Abeille (premières communications effectuées).

3° Des projets ponctuels en voie de mise au point : recherches sur les glucides des pucerons, de leurs hôtes et de leurs prédateurs, des oeufs d'Ephestia, analyse des caroténoïdes du miel, des protéines chez les noctuelles, de l'éthylène émis par les fruits.

4° La préparation de Recherches d'assez vaste échelle à propos des lipides d'insectes (en particulier les noctuelles) nécessitant une approche technique approfondie rendue possible par l'acquisition progressive d'un équipement de plus en plus complet.

Le calendrier élaboré en début d'année (joint en annexe) a été quelque peu bousculé par le développement a priori imprévu des travaux d'enzy-mologie chez l'Abeille. Cependant, au bilan du 1er semestre, il apparaît que les démarches expérimentales et le dépouillement des résultats ont finalement progressé de façon satisfaisante, au prix, toutefois, d'un effort redoublé laissant une place résiduelle trop faible octroyée à la réflexion et à la rédaction.

(*) Il est entendu qu'en matière scientifique, tout aboutissement est considéré comme provisoire !...

Première Partie

RAPPORT SCIENTIFIQUE

Exposé succint et données numériques acquises au cours des travaux les plus récents

CHAPITRE I

Sur l'acide ascorbique et ses dérivés chez quelques insectes phytophages.

a) dégradation oxydative de l'acide ascorbique (ASC) dans les milieux d'élevage.

Le manuscrit rédigé en 1973 a été revu et approfondi sous un angle plus fondamental (en liaison avec l'INSA-Lyon) car la précision des résultats a permis de déterminer divers paramètres thermodynamiques (énergie d'activation thermique etc...). (projet pour les Annales INRA)

b) L'acide ascorbique chez les larves de *C. suppressalis* élevées sur milieu artificiel.

Une étude des interrelations entre la concentration en acide ascorbique du milieu, des larves à divers stades, et de leurs excréments a donné les résultats résumés ci dessous, et obtenus dans les conditions normales d'élevage.

- teneur des larves et de leurs excréments en fonction de l'âge.

Les résultats figurent dans le tableau I. Ils correspondent à des animaux élevés pendant les dernières 48 h sur un milieu de teneur moyenne 2,6 mg ASC/g.

Tableau 1. ASC. Influence de l'age - N = 5 incertitude relative i.r. = ± 2,5% - teneur du milieu : 2,6 mg/g

Age (Jours) (x)	teneur des larves (y) mg/g	teneur des excr.ts mg/g
5	0,55	0,17
15	0,47	0,9
17	0,39	1,1
19	0,38	1,2
22	0,25	2,1
25	0,22	2,2

teneur des larves : corrélation linéaire $\rho = -0{,}947$ $y = -0{,}017\,x + 0{,}67$

- <u>teneur des larves en fonction de la teneur du milieu.</u>

le tableau 2 résume les résultats à 4 stades successifs.

Tableau 2. ASC. Influence de la teneur du milieu. (Moy. de 5 mesures)

ASC. en mg/g chez :	milieu 0,13 mg/g	milieu 1,4 mg/g	milieu 2,6 mg/g	milieu 3,5 mg/g
larves de 8j	0,29	0,36	0,55	...
larves de 14,5j	0,14	0,25	0,44	...
Larves de 20j	0,10	0,20	0,38	...
Larves de 24j	0,08	0,21	0,24	0,25

tableau 3 - étude détaillée sur les larves de 5e stade et leurs excréments. N désigne le nombre de déterminations

teneur du milieu mg/g	teneur des larves mg/g	N
0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01	5
0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,01	3
0,80 ± 0,08	0,20 ± 0,02	5
1,5 ± 0,03	0,21 ± 0,02	3
2,4 ± 0,04	0,24 ± 0,06	5
3,0 ± 0,2	0,25 ± 0,01	3
3,9 ± 0,3	0,255 ± 0,010	6

La concentration intra cellulaire acquise en 48 h par les larves pourrait être assimilée au résultat d'une vitesse de réaction enzymatique dépendant de la concentration en substrat (ASC) offerte dans le milieu. dans ces conditions, la concentration larvaire L s'exprimerait en fonction de $(ASC)_{milieu}$, de la concentration larvaire maximale LM, et d'une constante (d'affinité entre le système enzymatique et ASC) K : $L = \frac{LM \cdot (ASC)^n}{K + (ASC)^n}$

De fait, la courbe modifiée $\log \frac{L}{LM - L} = n \log(ASC) - \log K$ est une droite ($\rho = 0{,}993$) donnant $K = 0{,}44$ mg/g de milieu
$n = 0{,}615$: ordre de la réaction.

Ceci pourrait constituer l'amorce d'une théorie sur le mécanisme de pénétration de l'ASC. dans le milieu cellulaire des larves.

• Transit de ASC en fonction de l'age -

le tableau 4 - indique la proportion d'acide ascorbique résiduel des excréments en fonction de la teneur des larves et de celle du milieu. (moyennes de 5 à 10 mesures)

Tableau 4 - ASC - Transit à divers stades - concentrations exprimées en mg/g -

Age Jours (x)	Rapport (y_1) $\frac{\text{Excréments}}{\text{Milieu}}$	Rapport (y_2) $\frac{\text{Excréments}}{\text{Larves}}$
5	0,27	0,49
7	0,20	0,79
15	0,41	0,89
17	0,44	1,12
19,5	0,48	1,26
23,5	0,57	1,78

Corrélations linéaires (N = 6 couples de points) :

Excréments / milieu : $\rho = 0,968$ $y_1 = 0,018\,x + 0,128$

Excrements / Larves : $\rho = 0,936$ $y_2 = 0,058\,x + 0,216$

• Discussion -

L'influence du stade et du milieu peut s'exprimer selon une analyse de variance à partir d'un bilan établi sous forme de tableau à 2 entrées (Tableau 2)

facteur A (milieux) $K_A = 3$
facteur B (stades) $K_B = 4$

Variances :	$s^2 A = 0,0632$	d.d.l. 2
	$s^2 B = 0,0275$	3
Var. résiduelle	$s^2 E = 0,0106$	11

facteur A : $F = 63,2$ $\quad F_{2,5\%} \left(\begin{array}{l} \nu = 2 \\ \nu' = 11 \end{array} \right. = 5,26$

facteur B : $F = 27,5$ $\quad F_{2,5\%} \left(\begin{array}{l} \nu = 3 \\ \nu' = 11 \end{array} \right. = 4,63$

L'influence des deux facteurs est donc hautement significative.

En conclusion, la concentration intra cellulaire des larves en ASC. est en forte corrélation linéaire :

- positivement avec celle du milieu
- négativement avec l'age des larves.
- positivement avec la concentration des excréments.

et la concentration des excréments représente une fraction de la concentration du milieu et de celle des larves qui augmente avec l'âge.

Ces divers éléments permettent en particulier de penser que les besoins des larves en ASC. diminuent avec l'âge, ce qui confirme les indications fournies par l'étude de la dégradation oxydative de l'ASC. dans les milieux.

Ces résultats concordent également avec diverses indications bibliographiques et devraient être publiés dans les meilleurs délais.

(projet pour Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.)

c) Détermination des paramètres d'oxydation ménagée de l'acide ascorbique (ASC.) en acide déhydro ascorbique (DHASC) in vitro, en milieu péroxydique.

En présence d'H_2O_2 à faible concentration, ASC. se transforme en DHASC., même en solution concentrée. Le rendement de la réaction atteint 85 %. Les différents facteurs intervenant dans la réaction ont été étudiés.

L'application de ce travail a permis la préparation de milieux nutritifs destinés aux carpocapses, dans lesquels ASC. était remplacé entièrement par DHASC.

Le manuscrit est au stade de la relecture et des corrections finales.

d) Effets biochimiques de l'ASC. et de DHASC chez les larves de *Laspereysia pomonella* en élevage sur milieu artificiel aseptique.

• Effets de Concentrations croissantes en ASC. ou DHASC. dans les milieux sur la glycémie des Larves.

Les résultats sont indiqués dans le tableau 5 (milieux avec ASC.) et le tableau 6 (milieux avec DHASC)

Les élevages à partir des conditions expérimentales définies au Laboratoire ont été réalisés à St Christol lès Alès par Madame IVALDI.

Tableau 5. Glycémie des larves élevées sur des milieux de concentrations croissantes en ASC. (N désigne le nombre de déterminations - (teneurs en sucres expr. en nmoles/µl)

	Concentration en ASC. dans les milieux (mg/g)					
	0	0,125	0,50	1,0	2,0	4,0
Poids des larves (mg)	4,4 ± 1	59,5 ± 9,5	50,5 ± 5,8	48,5 ± 4,5	59,5 ± 11,1	50,1 ± 4
Volume d'hémolymphe en µl/mg poids frais	0,28	0,31	0,27	0,28	0,25	0,20
Tréhalose	10 ± 3	17,8 ± 0,2	41,5 ± 7,3	39,6 ± 3,6	15,0 ± 1,2	16,5 ± 1,9
Saccharose ...	0,04 ± ε	0,3 ± 0,2	0,35 ± 0,05	0,40 ± 0,16	0,64 ± 0,33	0,16 ± 0,02
Glucose	3,3 ± 0,9	1,3 ± 0,1	0,55 ± 0,24	1,1 ± 0,4	0,66 ± 0,53	0,81 ± 0,02
Fructose	0,38 ± 0,04	0,27 ± 0,1	0,13 ± 0,03	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,45 ± 0,11
Maltose	—	5,8 ± 0,7	++++	++	+	4,5 ± 1,1
Polyholoside ...	++	...	+	+	+++	...
Sucre non identifié (proche du galactose)	1,2 ± 0,5	0	0	0	0	...
N	2	3	8	8	8	2

Le poids des larves chute pour des doses très faibles (< 0,125 mg/g) tandis que la volémie relative au poids varie très peu.

Le stock de tréhalose (glucide de réserve) est maximum chez les larves élevées sur des milieux titrant 0,5 et 1 mg/g d'ASC.

La carence totale avec agonie irréversible des larves est accompagnée d'une tréhalosémie faible, d'une forte glycémie (le métabolisme du glucose doit être ralenti) et il apparait un glucide supplémentaire caractéristique de cet état physiologique.

Tableau 6 - Glycémie chez les larves élevées sur milieux contenant des concentrations croissantes en DHASC

	Concentrations en DHASC. dans les milieux (mg/g)					
	0	0,10 (1)	0,10 (1)	0,40	0,80	1,60
Poids des larves (mg)	4,4 ± 1	4,5 ± 0,5	37 ± 16	...	...	49 ± ε
Volémie µl/mg	0,28	0,18	0,31	...	...	...
Trehalose ...	10 ± 3	14,7 ± 0,2	15,5 ± 0,1	19 ± 9	15 ± 7	18 ± 7
Saccharose ...	0,04	0	0,25 ± 0,2	...	...	...
Glucose ...	3,3 ± 0,9	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,6	2,8 ± 0,5
Fructose ...	0,38 ± 0,04	0,28 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,5	0,5 ± 0,2	1,0 ± 0,6
Maltose ...	...	-	4,1 ± 0,4	2,5 (2)	1,5 (2)	1,5 (2)
Sucre non identifié ... (proche du galactose)	1,2 ± 0,5	1,06 ± 0,01	0	0	0	—
N = 3 mesures						

(1) L'élevage à faible dose de DHASC. a donné lieu à 2 lots de larves, les unes présentant les signes de carence, les autres de taille normale.

(2) résultats incomplets.

La dose 0,10 mg/g de DHASC. paraît constituer un seuil inférieur, puisqu'une partie des insectes ne s'est pas développée, dans ce cas, et a présenté les signes biochimiques d'une carence importante.

Les larves se développent très bien en présence de DHASC. et se métamorphosent normalement dans les autres cas.

La principale différence avec celles élevées en présence d'ASC. paraît être une tréhalosémie plus faible.

• Effets de la concentration du milieu en ASC. ou DHASC. sur les acides aminés libres de l'hémolymphe.

La partie expérimentale du travail a été réalisée, mais le dépouillement des résultats est encore en cours.

Note annexe : précision des dosages colorimétriques de l'acide ascorbique (décoloration d'une quantité connue de Dichloro-2-6 phénol-indo-phénol en temps limité)

Dosages-Exemples : Milieu contenant des larves depuis 1 semaine.

N = 9 mesures exprimées en mg/g

x_i : 1,65 ; 1,72 ; 1,69 ; 1,71 ; 1,52 ; 1,52 ; 1,64 ; 1,51 ; 1,64

$\bar{x} = 1,622$

Variance de l'échantillon :

$s_x^2 = 0,0842^2$

Intervalle de confiance (seuil 5%)

$i = \pm 0,055$ (3,4%)

Milieu frais ne contenant pas de larves

N = 5 mesures (mg/g)

x_i : 5,45 ; 5,60 ; 5,60 ; 5,50 ; 5,45

$\bar{x} = 5,520$

Variance $s_x^2 = 0,0758^2$

$i = \pm 0,066$ (1,2%)

CHAPITRE II

SUR LES PROTÉINES DE L'HEMOLYMPHE CHEZ L'ABEILLE *Apis mellifica* L.

a) Etude quantitative des principales Fractions protéiques de l'hémolymphe au cours du développement de l'Abeille de race noire.

Une analyse aussi précise que possible a été réalisée au moyen de la technique d'électrophorèse en tubes de gels de polyacrylamide. Les résultats ont donné lieu à deux publications résumées ci-dessous (Apidologie, 1975, 3) :

LES PROTÉINES DE L'HÉMOLYMPHE CHEZ L'ABEILLE *APIS MELLIFICA, MELLIFICA* L.

I. — Larves, nymphes et adultes naissantes

RÉSUMÉ

Les différentes fractions constituantes des spectres de protéines de l'hémolymphe d'Abeille (*Apis mellifica, mellifica* L.) ont été classées et analysées qualitativement et quantitativement par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, chez les larves, les nymphes et les ouvrières naissantes, ainsi que chez les larves mâles. 22 fractions ont été ainsi dénombrées et réparties en 6 groupes: la variabilité des concentrations relatives de 15 d'entre elles, par rapport à l'ensemble du spectre a été déterminée à chaque stade. Les résultats ont permis de caractériser les modifications survenues au cours du développement et de faire apparaître différents types de spectres possibles au sein d'une population, pour un même stade. Dans ce cas, les variations observées sont essentiellement de nature quantitative.

LES PROTÉINES DE L'HÉMOLYMPHE CHEZ L'ABEILLE *APIS MELLIFICA, MELLIFICA* L.

II. — Adultes butineuses et hivernantes

RÉSUMÉ

Le spectre protéique de l'hémolymphe d'Abeille, race noire, se compose de 18 fractions principales dont les poids moléculaires s'échelonnent de 40 000 à 450 000. 16 de ces fractions a été analysée quantitativement par électrophorèse en gel de polyacrylamide chez les ouvrières butineuses et hivernantes ainsi que chez les reines et les mâles. Les fractions homologues de celles précédemment déterminées chez les larves, nymphes et naissantes ont été retrouvées à des concentrations différentes chez les adultes. Les différentes castes ne se distinguent que par la modification des concentrations relatives de certaines protéines de poids moléculaire élevé, et les hivernantes diffèrent également des butineuses par des variations quantitatives du spectre.

b) Application à la comparaison de quelques races

Le tableau 1 résume les principaux résultats obtenus à partir de 4 races sélectionnées. Une incertitude subsiste cependant en ce qui concerne la ruche carnica, par suite d'un changement de reine survenu à un moment non déterminé.

Tableau 1. Variations de composition protéique dans l'hémolymphe de diverses races d'Abeilles. N désigne le nombre de déterminations.

Fractions	race Caucasica	race Ligustica	race Mellifica	race Carnica
A I	14,0 ± 1,4	11,2 ± 1,0	9,6 ± 1,3	7,2 ± 2,4
A II	13,6 ± 1,1	13,3 ± 1,1	12,8 ± 1,4	11,8 ± 1,9
Rapport AI/AII ...	1,03 ± 0,09	0,84 ± 0,05	0,75 ± 0,13	0,60 ± 0,16
B II - I	10,2 ± 1,5	4,8 ± 1,5	3,3 ± 1,0	3,6 ± 0,1
C1 + C2	28,8 ± 3,5	32,4 ± 3,5	37 ± 3,7	41,7 ± 4,3
D2	1,8 ± 0,5	2,1 ± 0,4	2,5 ± 0,8	2,7 ± 1,1
E1	0,98 ± 0,50	1,1 ± 0,1	1,3 ± 1,1	2,0 ± 0,2
F1	2,3 ± 0,4	4,3 ± 0,6	3,9 ± 1,3	5,9 ± 1,1
N	8	8	7	3

Les différentes races analysées ne diffèrent pas par la composition qualitative du spectre protéique de leur hémolymphe, mais par des variations de la concentration spécifique de certaines fractions.

Le tableau 2 indique certaines fractions permettant d'établir une différence significative entre 2 races à partir d'un échantillon d'effectif indiqué entre parenthèses.

Tableau 2. Critères significatifs pour la comparaison des races d'Abeilles - les effectifs minimum sont indiqués entre parenthèses - (Comparaisons au moyen du Test "t").

Races comparées :	Critères significatifs (et nombres de mesures exigés).
Mellifica / Ligustica	AI (5) - C1+C2 (8) - AI/AII (16)
Mellifica / caucasica	BII-1 (1 à 2) - AI/AII (5) - F1 (5) - C1+C2 (8)
Ligustica / caucasica	BII-1 (1 à 2) - F1 (5) - AI (8) - C1+C2 (15)

Les groupes A, B, C et F sont les plus efficaces pour la comparaison des races.

Ligustica et Mellifica sont très voisines, bien que la couleur de l'abdomen des Abeilles soit très différente.

Par contre, Caucasica présente un élément distinctif très spécifique : l'importance quantitative de la fraction BII-1 qui permet une caractérisation à partir de 1 à 2 individus seulement.

Carnica se situe près de Mellifica, sur le plan des ressemblances biochimiques, mais s'éloigne un peu plus de Ligustica et très nettement de caucasica.

Les techniques ont fait l'objet d'une communication au II^e Coll. INRA de Biochimie à Maisons Alfort, et les résultats complets de comparaisons entre races constitueront la note n° III dans Apidologie. Les données présentées ci-dessus sont extraites d'une note au Congrès APIMONDIA.

c) Etude des Hybrides

Une étude a été réalisée à partir d'hybrides ligustica x Caucasica. Bien qu'une partie seulement des résultats soit dépouillée, certaines indications peuvent être tirées : Les hybrides présentent un spectre protéique intermédiaire entre les "parents", mais il est apparu chez certains individus une prédominance pour certains caractères italiens ou Caucasiens montrant que les Abeilles ne provenaient vraisemblablement pas toutes de la même génération - (Tableau 3)

Tableau 3 - Résultats préliminaires concernant l'analyse du spectre protéique des hybrides Ligustica x Caucasica.

Groupes et fractions	Ligustica pure	HYBRIDES : résultats individuels - (% de la quantité totale) Abeille 1	Ab. 2	Ab. 3	Ab. 4	Ab. 5	Ab. 6	Caucasica pure
A I	11,2	12,4	13,8	11,6	14,2	16,2	15,1	14,0
A II	13,3	12,7	14,2	12,7	13,7	9,7	13,2	13,6
AI/AII	0,84	0,98	0,98	0,92	1,2	1,5	1,2	1,03
BI 1...	1,97	1,2	1,3	1,3	1,15	1,4	3,7	2,0
2..	4,4	2,4	2,9	3,6	4,5	3,8	3,7	3,7
3..	1,9	1,8	1,3	1,8	1,6	2,8	1,5	2,3
BII 1..	4,8	3,0	4,8	3,3	4,5	4,8	7,6	10,2
C_1+C_2...	32,4	45	37	41	39	44	35	28,8
C_3	3,5	4,8	4,2	2,3	4,1	4,2	4,1	3,0
D2	2,1	2,1	1,9	1,8	1,6	1,7	1,5	1,85
E1......	1,0	1,2	0,95	0,76	0,46	0,7	1,1	0,91
E2	0,7	0,9	0,5	0,76	0,46	1,0	0,38	0,15
F1	4,3	2,1	1,7	2,3	1,8	1,0	0,6	2,3
F2	0,96	0,4	0,6	0,4	0,23	0,35	0,38	0,4
F3	0,33	0,4	0,3	0,5	0,2	0,3	0	0,1

De nouvelles séries d'électrophorégrammes ont été enregistrées et les résultats seront communiqués vers la fin de l'année.

d) Projets à court terme.

L'étude des spectres enzymatiques (zymogrammes) a donné des résultats positifs dans la comparaison de certains génotypes (mutants et Témoins d'Arabidopsis : BOUNIAS, 1973 - A.I.S., Gottingen 10, 28-29). Cette technique, après une période creuse d'origine commerciale, redevient opérationnelle sous l'impulsion, en particulier, de M. LAVIOLETTE et son équipe.

Le procédé APIZYM devrait donc être appliqué aux Abeilles, de même qu'aux noctuelles. Ce travail est programmé au Laboratoire pour un très proche avenir.

CHAPITRE III

SUR LES PROTEINES DE L'HÉMOLYMPHE CHEZ *Noctua pronuba* (*Lepidoptera*, *Noctuidae*) -

a) classification provisoire des fractions protéiques de l'Hémolymphe -

L'hémolymphe de *Noctua pronuba* a été soumise à électrophorèse en tubes de gels de polyacrylamide selon la technique déjà décrite chez l'Abeille - (gels à 7,5 % d'acrylamide - pH 8,5)

24 fractions principales ont été caractérisées par leur mobilité électrophorétique et classées par comparaison avec la mobilité de protéines-étalons de Poids Moléculaires connus -

Le Tableau I indique les résultats obtenus, comparés à ceux précédemment déterminés chez l'Abeille -

La méthode sera ensuite comparée à l'électrophorèse sur plaques avec gradient de polyacrylamide dont la mise en oeuvre a été récemment abordée au laboratoire -

Tableau 1 - Ebauche d'une classification des protéines de Noctua pronuba, d'après la méthode d'électrophorèse en tubes de gels de polyacrylamide (N = 8 mesures par fraction)

Noctua pronuba				Classes de Poids moléculaires (*)	Apis Mellifica
Groupes	Fractions	Mobilités (mm)	Variances		Groupes (Fractions)
A	I	1,6	0,4	450 000	A I
	II	4,8	0,6	325 000	A II
	III	8,06	0,82	265 000	B I (1-2)
B	1	11	0,5	235 000	B II (1-2-3)
	2	12,7	0,7	210 000	C (1)
	3	14,6	0,85	200 000	(2) (3)
C	1	17,6	0,91	173 000	D (1-2)
	2	19,7	0,95	162 000	
	3	21,0	0,70	155 000	E (1-2-3)
D	1	23,07	0,93	145 000	
	2	25,8	1,03	130 000	
	3	27,3	1,0	123 000	
E	1	30,4	1,15	110 000	
	2	34,3	1,5	97 000	
	3	38,1	1,4	87 000	F (1-2-3)
F	1	42,9	1,4	77 000	
	2	45,6	1,75	66 000	—
	3	48,4	1,8	60 000	...
G	1.....	52	1,6	53 000	
	2	54	1,5	44 000	
	3	58	1,3	39 000	
H	1	61,8	1,6	30 000	
	2	65	1,43	26 000	
	3	66,9	1,2	21 000	

(*) Les poids Moléculaires indiqués sont ceux des étalons : la correspondance entre P.M. et mobilité, pour les fractions de l'hémolymphe, n'est rigoureuse que sur gradient (projet à l'étude) ou après dénaturation des protéines par un détergent (Sodium Dodécyl Sulfate, p. ex.) qui annule les effets des radicaux ionisés.

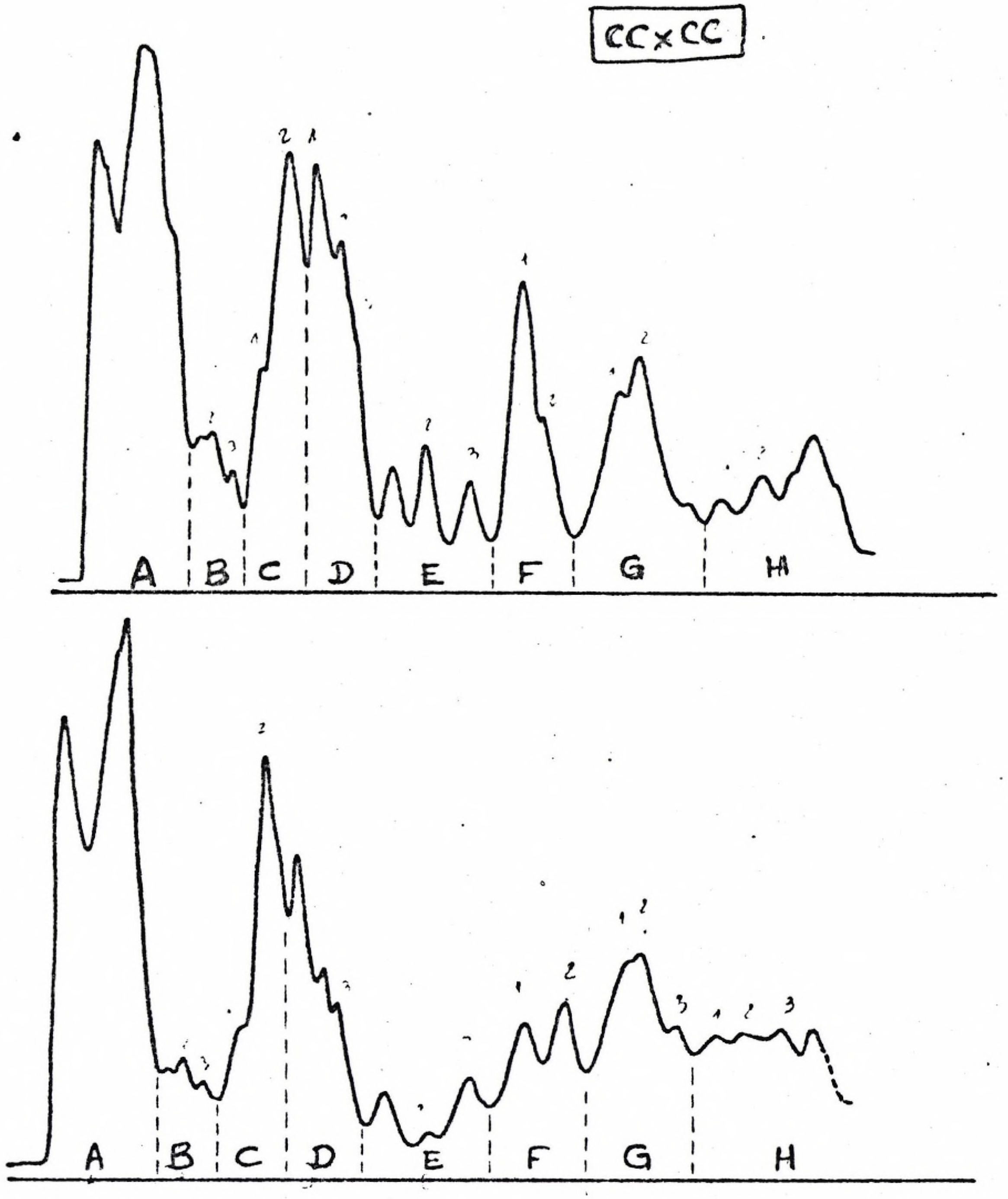
L'examen du tableau 1 montre un excellent étalement des fractions tout au long du gel (longueur 67 à 68 mm en moyenne) ce qui place la Noctuelle à un niveau plus favorable que l'Abeille dont les fractions protéiques sont groupées de façon plus serrée dans la zone des hauts P.M.

b) Comparaison du spectre protéique de trois lignées (étude préliminaire).

Les trois lignées définies par POITOUT en fonction de la coloration de l'adulte (c = clair g = gris f = foncé) ont été analysées du point de vue biochimique.

Les résultats figurant dans le tableau 2 expriment, comme chez l'Abeille, la proportion de chaque fraction par rapport à l'ensemble.

Les fig 1a et 1b présentent les enregistrements photométriques correspondants.



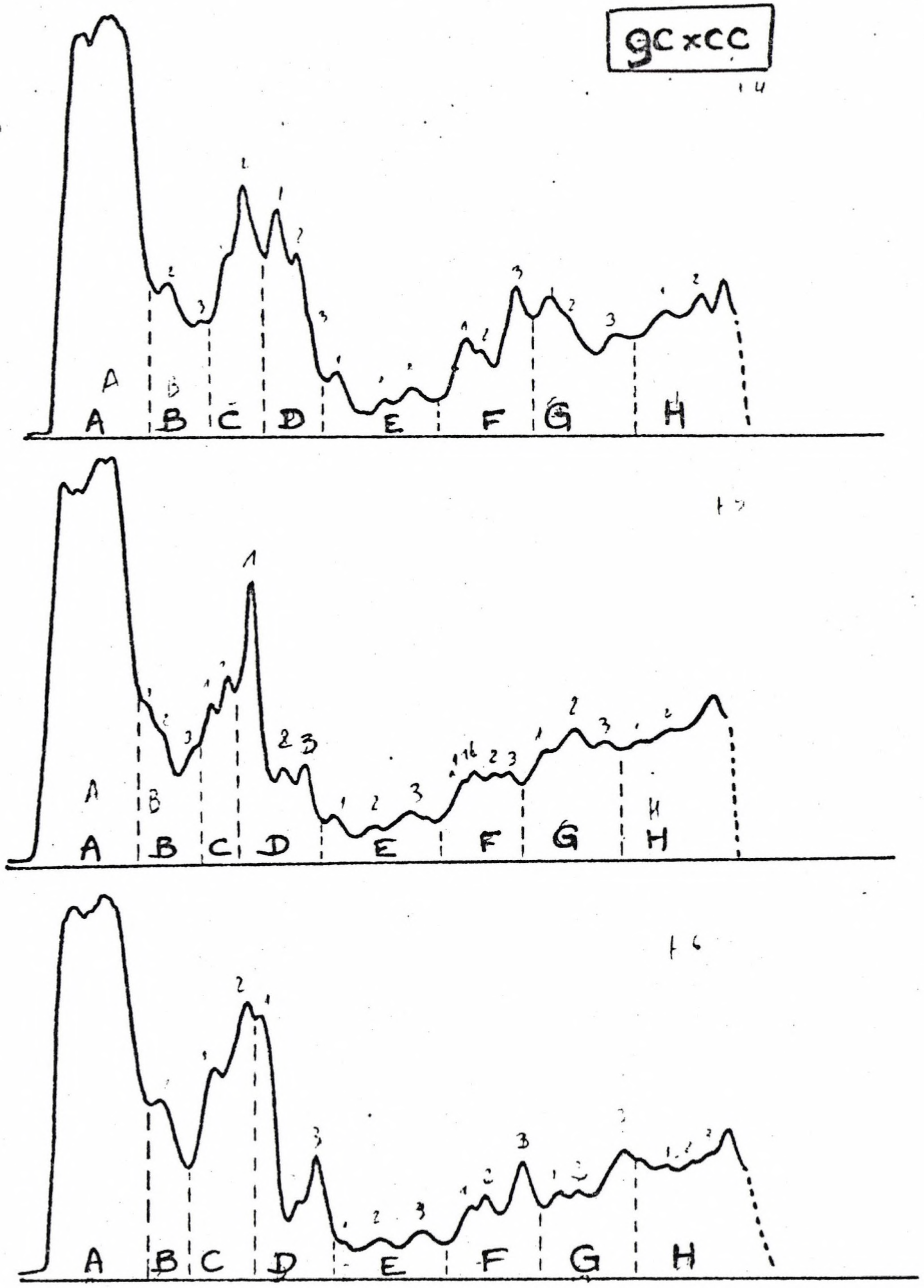


Fig. 1a - Enregistrements photométriques d'électrophorégrammes de protéines de l'hémolymphe de noctuelles : lignées cc × cc et gc × cc

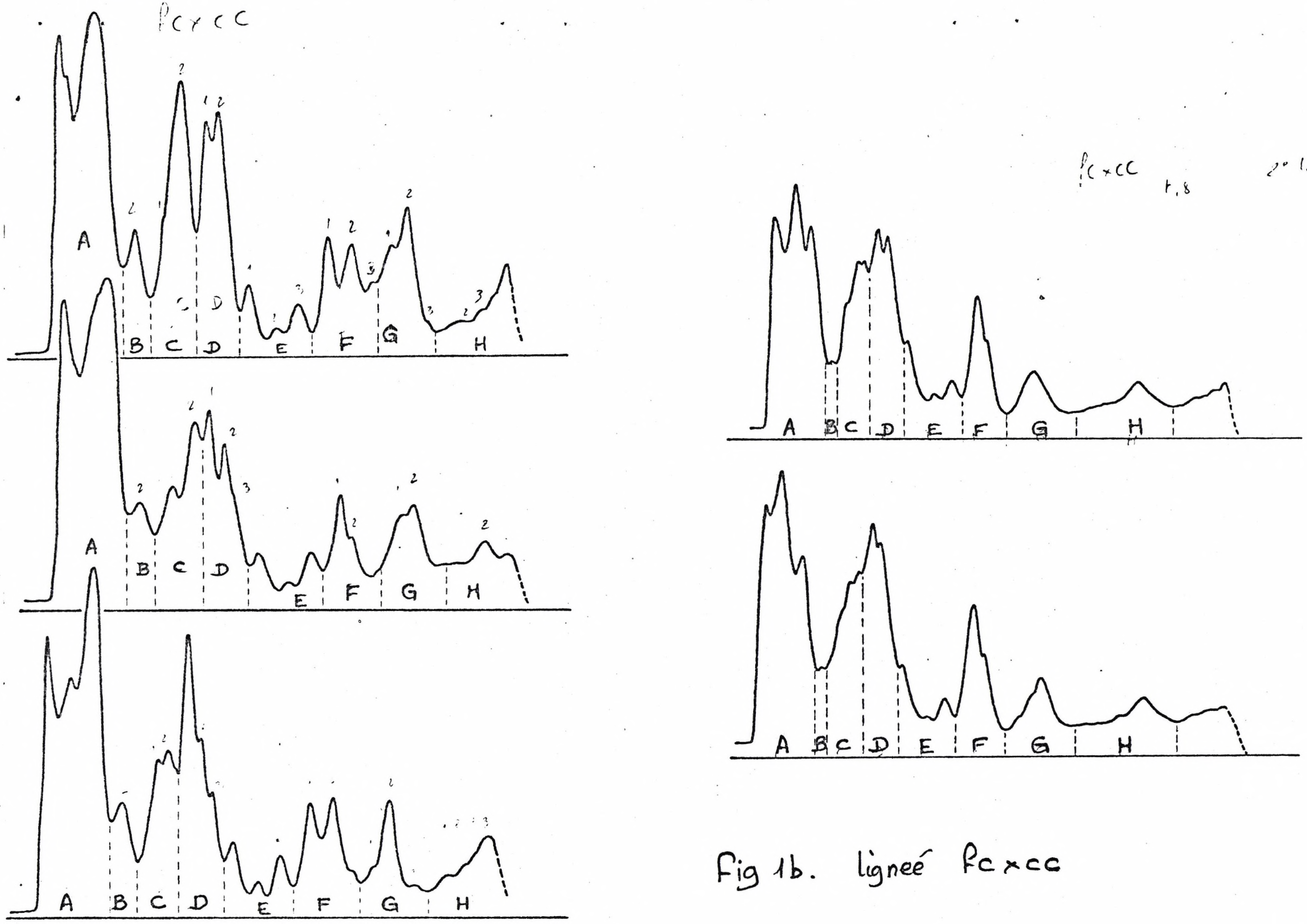


Fig 1b. lignée Fc x cc

Tableau 2 - Spectres protéiques de l'hémolymphe de noctuelles individuelles issues des lignées cc × cc, fc × cc, gc × cc

Groupes	Fractions	cc × cc				fc × cc				
		Larve 1	2	3	4	Larve 1	2	3	4	5
A	I ...	10,9	12,0	12,5	16,4	13,8	10	16,8	10,4	22,5
	II ...					....	11	...	...	...
	III ...	22,5	22,5	25,6	30,0	25,2	20	29,2	40,2	33,6
B	1	1,3	0,9	1,0	1,3					
	2	2,2	1,6	1,9	1,6	5,0	5,1	4,84	2,2	5,2
	3	0,9	0,7	1,3	0,5					
C	1	2,6	1,9	2,7	1,3	0,75	5,7	6,3	13,4	7,5
	2 ...	11,6	11,2	11,7	3,2	15,2	6,9	8,3	...	5,7
	3	–								
D	1	7,8	5,6	8,3	4,9	4,6	10,6	6,5	6,7	4,0
	2 ...	7,1	3,2	3,2	1,6	5,5	3,3	4,7	3,3	2,9
	3 ...		1,6	3,8		4,1	2,9	2,0	1,7	1,9
E	1	1,9	0,9	4,0	1,1	1,6	1,8	1,25	0,7	0,6
	2	2,2	0,1	0,2	0,2	0,25	0,3	0,1	0,5	0,2
	3	1,6	2,1	1,8	1,4	1,1	1,5	1,4	1,3	0,6
F	1	6,2	3,8	3,0	3,4	3,3	4,1	3,4	1,7	3,1
	2	1,5	4,3	2,4	4,1	4,0	5,0	1,9	1,2	1,0
	3	0	0	0	0	0,75	0,45	–	0,3	0,2
G	1	4,0	5,1	1,9	3,6	3,6	0,9	3,3	1,3	2,1
	2	6,1	5,3	4,9	4,1	5,6	4,2	4,2	–	2,1
	3 ...	0,7	3,2	1,1	4,1	0,4	0,45	0,46	–	0,6
H	1	1,6	3,9	0,8	2,3	–	0,3	0,46	1 –	1,0
	2	2,2	3,0	0,96	2,0	–	0,9	0,78	1,0	1,3
	3	2,6	3,7	2,2	2,1	0,7	1,1	2,5	2,3	1,7

Tableau 2 (suite). lignée gC×CC.

Groupes	Fractions	Larve 1	2	3	4	5
A		38,8	39,8	39,5	39,7	48,8
B	1	-				
	2	5,25	5,1	6,8	6,4	7,2
	3	1,3				
C	1	1,9	3,4	7,0	4,8	2,2
	2	10,1	4,1	8,8	2,2	4,0
	...	...				
D	1	5,1	7,9	6,3	12,6	3,8
	2	4,7	1,5	0,9	2,6	5,6
	3	0	1,9	2,3	...	0,9
E	1	0,9	0,3	0,2	3,0	1,6
	2	0,32	0,3	0,2	0,6	0,1
	3	0,8	1,2	0,5	0,4	0,2
F	1	2,2	3,3	1,3	0,6	0,2
	2	1,4	1,5	1,4	0,4	0,4
	3	4,6	1,5	3,2	4,0	2,5
G	1	4,1	2,9	2,0	2,8	1,1
	2	2,4	5,0	1,6	0,8	2,5
	3	...	2,9	7,9	7,0	1,8
H	1	2,2	...	1,8	1,0	2,7
	2	2,5	...	1,8	1,2	2,7
	3	2,9	...	2,2	1,4	3,1

Les corrélations protéinémie/coloration ne paraissent pas évidentes (ce qui est normal) et la classification des spectres est en elle-même très complexe, car différentes associations de fractions ne coïncident pas individu par individu.

Toutefois, le groupe A pourrait receler certaines coïncidences mais son étude sera améliorée sur plaques avec gradient de polyacrylamide.

La fraction F3 présente les meilleures analogies avec les lignées :

lignée	Moyenne de F3	Variance	N
cc × cc	0	–	4
fc × cc	0,425	$0{,}240^2$	4
gc × cc	3,160	$1{,}222^2$	5

Pour une étude plus précise, il conviendrait d'analyser les lignées f et g pures (lorsque leur obtention sera possible).

c) Projets

Les différentes lignées ou races de noctuelles seront analysées sur le plan de l'équipement enzymatique général (zymogramme) qui orientera les travaux suivants portant sur les systèmes iso-enzymatiques par électrophorèse sur plaque avec gradient. L'appareillage est à l'épreuve et sera fourni en grande partie aux utilisateurs intéressés après mise au point des méthodes.

CHAPITRE IV

ANALYSE DES METABOLITES LIBRES DE L'HÉMOLYMPHE DE DIFFERENTS INSECTES

Premiere partie :

Méthodes d'Analyse.

a) Micro-chromatographie quantitative des glucides

Au terme d'une étude assez complète de la mobilité des sucres sur plaques de gel de silice Merck, les propriétés chromatographiques de 17 glucides simples ont été décrites avec 30 systèmes de solvants d'élution, sur plaques tamponnées et sur plaques non tamponnées. (Publication prochaine).

Les figures 2a et 2b illustrent quelques unes des possibilités offertes par la méthodes.

Un nouveau réactif a été découvert par ailleurs ; ses propriétés particulières seront communiquées après une comparaison précise avec celles des réactifs classiques.

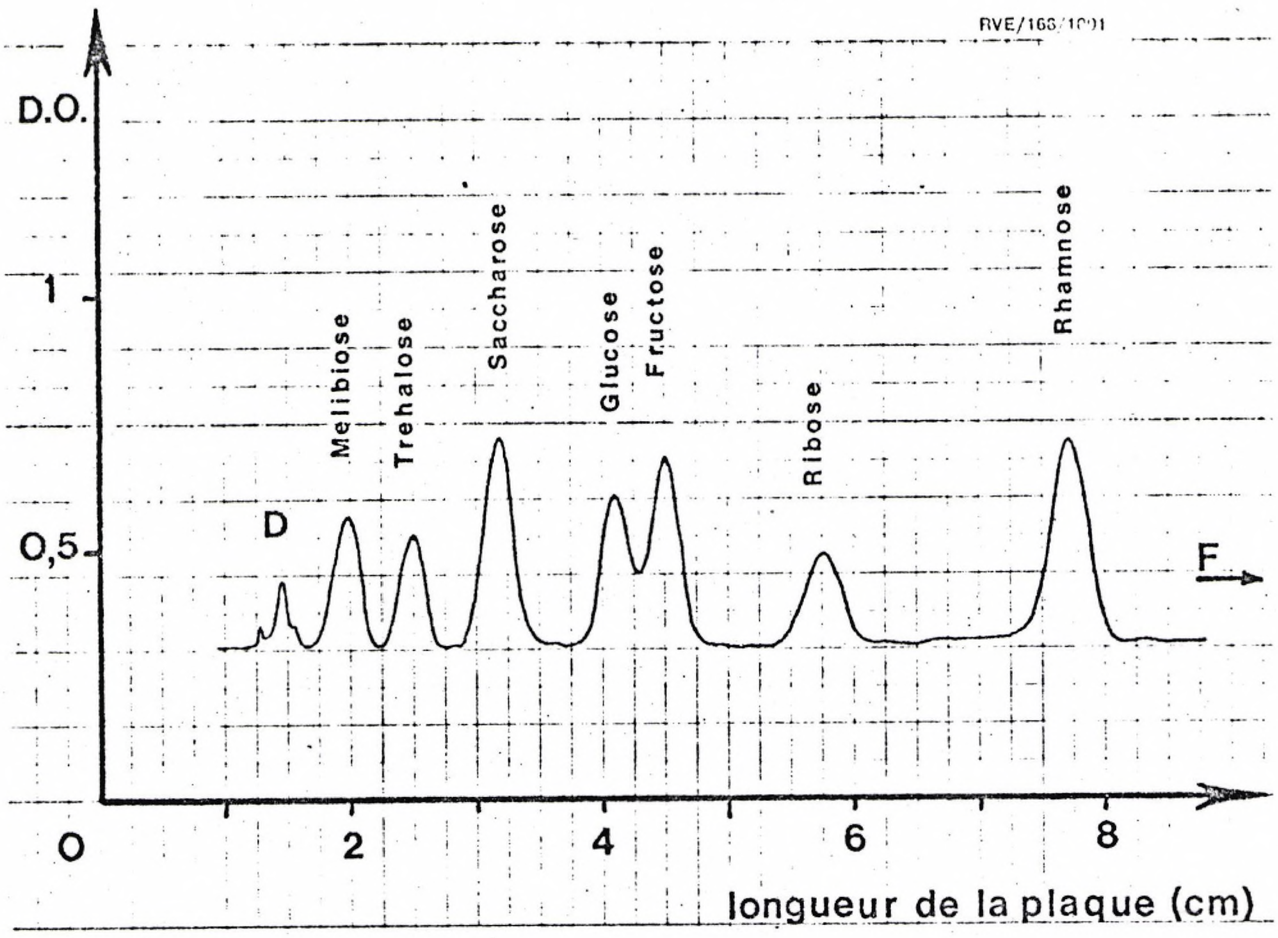


fig. 2 a - Analyse uni dimensionnelle des glucides
Eluants : n Butanol - n Propanol - Ac. acétique - eau : 2 migrations
n. Butanol, Ac. acétique - eau : 1 migration
Réactif : Naphtalène diol 1-3 en milieu alcool - sulfurique
Quantités separées : 1,25 nanomoles -

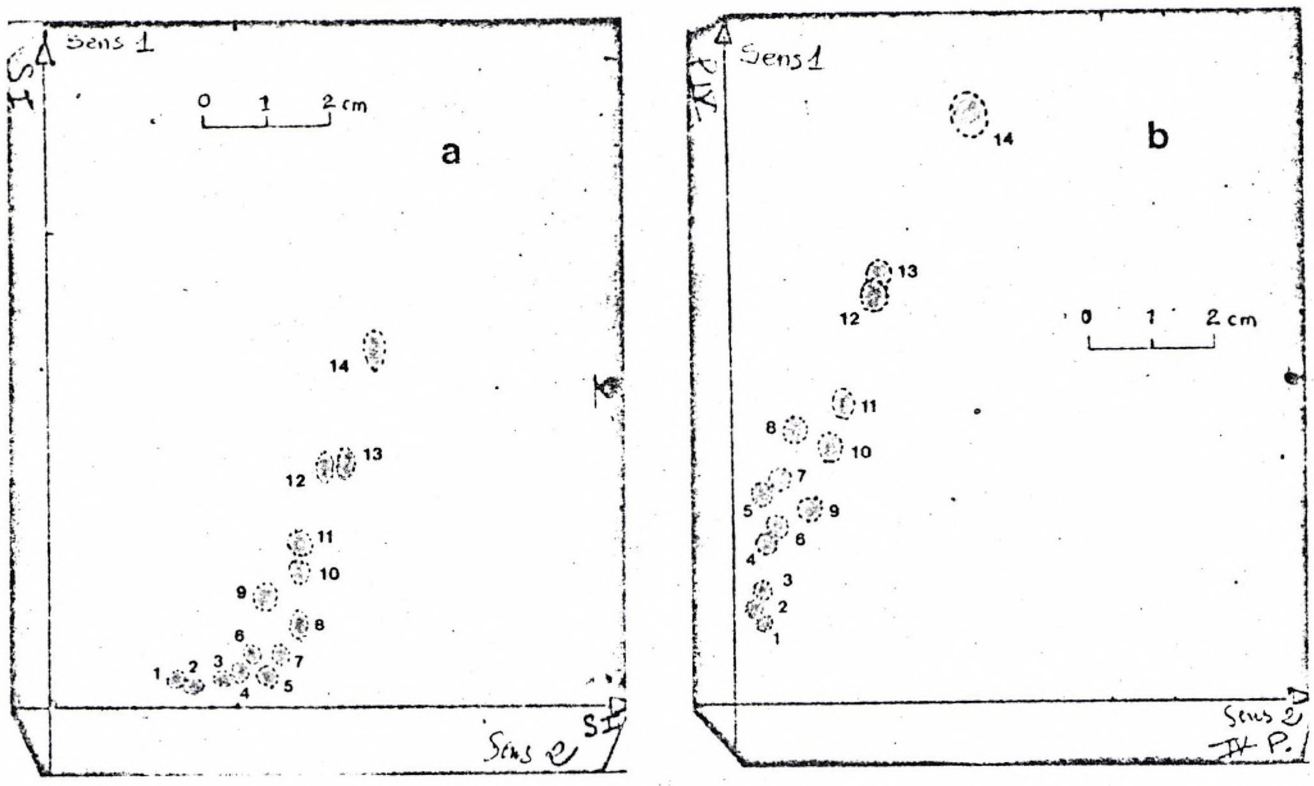


fig. 2 b - Analyse bi dimensionnelle des glucides
cliché de gauche : sens 1 : alc. amylique - Acétone - eau - sens 2 : n propanol - eau - Pyridine -
Cliché de droite : sens 1 : n propanol. eau. pyridine - sens 2 : n. Butanol - Ac. Acét. - eau -
Légende : 1 = Mélibiose 2 = Raffinose . 3 = Gentiobiose . 4 = lactose . 5 = Mélézitose
6 = tréhalose . 7 = maltose . 8 = Saccharose . 9 = galactose . 10 = glucose
[illegible] 13 = Xylose [illegible]

b) Micro chromatographie quantitative des acides aminés.

Les propriétés des plaques de gels de Silice ne sont pas aussi favorables à la séparation des acides aminés que celles des plaques de polycarbonate de diphényl propane (dont la fabrication a été supprimée).

Cependant, d'intéressantes séparations ont pu être obtenues à partir de couches minces de cellulose, avec le solvant iso propanol-eau. Différents types de résolutions sont alors obtenus en faisant varier la proportion d'eau dans l'iso propanol ainsi que le pH du tampon qui imprègne la cellulose. L'ensemble des données expérimentales permet la rédaction d'une note (problème de temps à lui consacrer !) attendue par divers utilisateurs intra et hors-INRA.

Compte tenu des potentialités du Laboratoire de l'INSA à LYON, ce chapitre ne sera pas davantage développé. La technique sera utilisée, en effet, à titre d'introduction, en préparation à l'analyse automatique "lourde".

c) Micro chromatographie quantitative des lipides.

Le travail est en cours et se poursuivra de façon continue au moins jusqu'à la fin de l'année. Des résultats positifs sont déjà enterinés dans deux domaines :

- analyse des grandes classes de lipides (stéroïdes, acides gras, glycérides, etc...)
- analyse des pigments chlorophylliens et caroténoïdes (présents chez certains insectes et dans les miels).

La couche mince servira ici d'introduction à la chromatographie en phase gazeuse.

d) Etude sur l'intégration des pics en chromatographie et en électrophorèse.

Les pics obtenus en chromatographie quantitative, après enregistrement photométrique des plaques révélées, sont analysés par intégration manuelle, tandis que les pics enregistrés à partir des gels d'électrophorèse sont analysés par intégration automatique (électro-mécanique).

Aucune difficulté n'apparaît lorsque les pics analysés sont bien séparés, mais la précision des résultats est critiquée dans les cas de chevauchement.

Les deux techniques ont donc été comparées à partir de deux pics "artificiels" de densité optique constante, soumis à un chevauchement progressif.

• **Méthodes** -

L'intégration automatique est réalisée par le photomètre : La ligne de base doit être préalablement réglée au "zéro" de l'intégrateur. L'appareil arrête le calcul entre 2 pics lorsqu'il se trouve un minimum entre les deux (fig A ci-dessous) et l'opérateur doit intervenir au jugé lorsque les deux pics ne sont séparés que par un point d'inflexion. (fig. B).

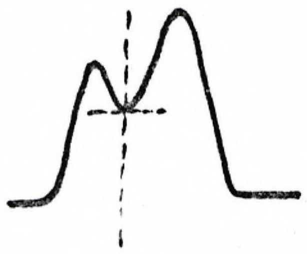


fig. A

fig. B

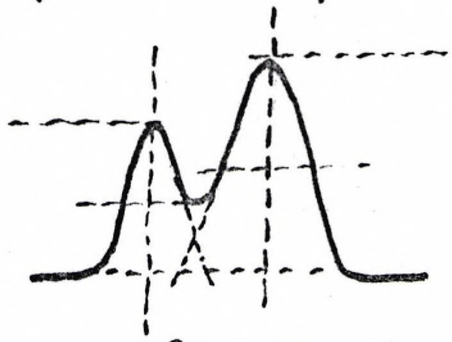


fig. C

L'intégration manuelle consiste à calculer le produit de la hauteur par la largeur à la demi-hauteur (aire d'un triangle équivalent) (fig. C).

La résolution "manuelle" des cas de chevauchement est basée sur le raisonnement suivant :

- au point précis de recoupement des pics théoriques (P) la densité optique (D. O.) résultante est la somme des D. O. correspondantes (et égales puisqu'à l'intersection des deux pics).

- En ce point, les 2 pics se croisent donc théoriquement au point de D.O. égale à la moitié de la valeur résultante enregistrée, ce qui permet de reconstituer arbitrairement deux faces (fig D → E → F) -

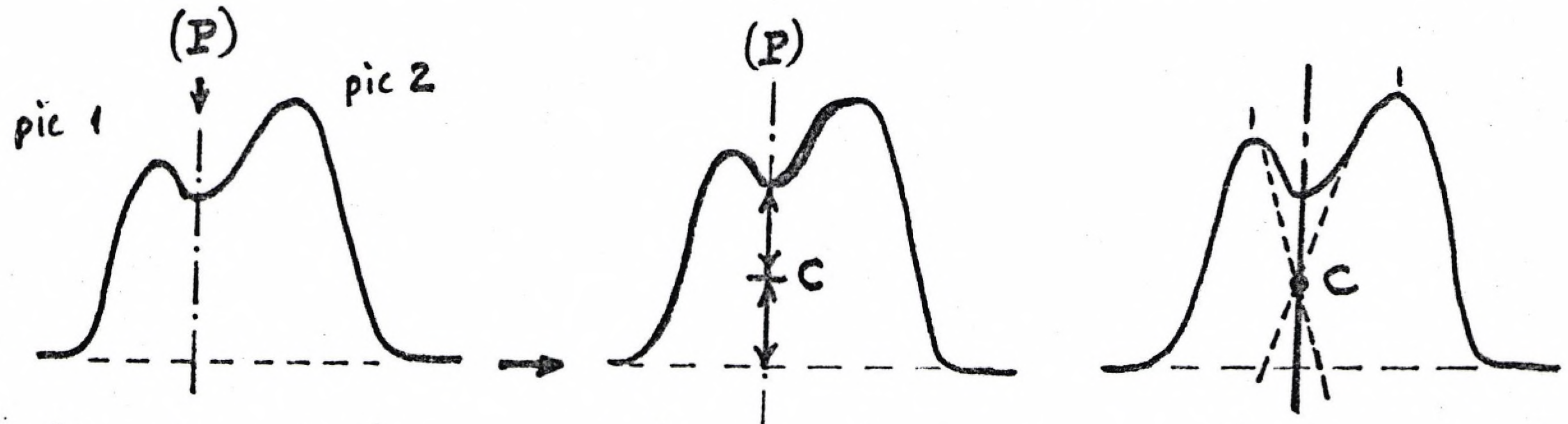


fig. D : recherche du point d'intersection par l'axe de chevau-chement.

fig. E - détermination du point théorique C de croisement des pics -

fig F - reconstitution simplifiée des pics à partir du sommet de chacun et du point C

La validité du calcul provient de ce que l'assimilation d'une courbe à une droite reconstituée est rendue légitime par le partage des surfaces gagnées et perdues en aires égales (fig. G)

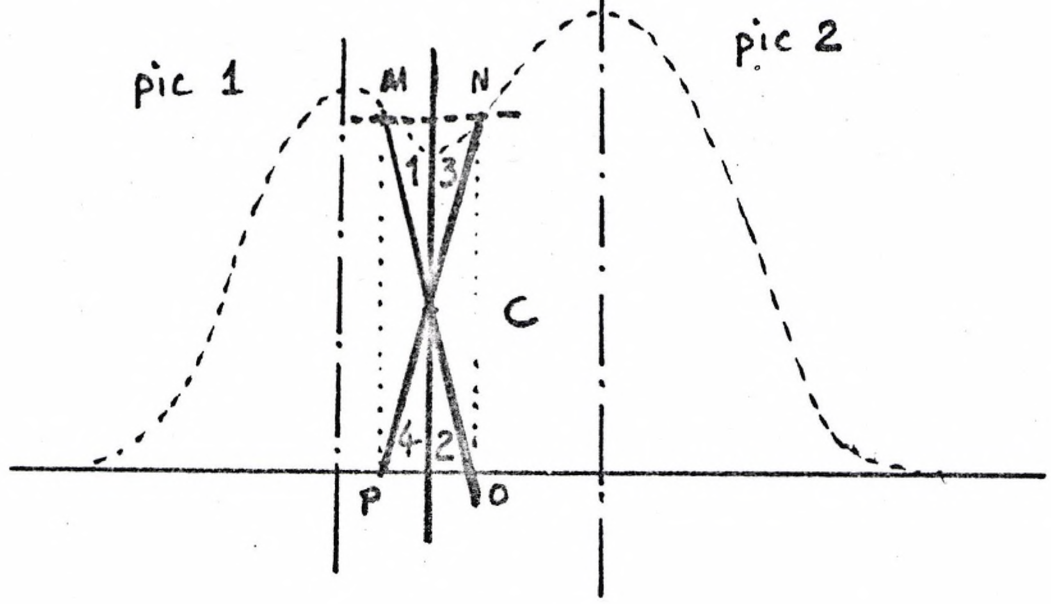


fig. G. - Le quadrilatère M N O P doit être un parallélogramme (ou s'en rapprocher au maximum) - les aires 1-2 3-4 égales deux à 2 - En M, le pic 2 cesse d'influer sur le pic 1 (M est la D.O. propre au pic 1 car en P la D.O. = 0) -

- Resultats.

Deux pics de densité optique définie ont été créés au moyen de taches dessinées sur calque et soumises à un chevauchement progressif. Le tableau 1 ci dessous indique les résultats obtenus par les 2 méthodes en fonction du taux de recouvrement R, ou de la distance entre sommets Δ (point de tangence pour Δ = 22,5 mm)

Tableau 1. Intégration de 2 pics en fonction de leur chevauchement

		Δ mm	30-40	20	15	12,5	10	5	2,5	0
		R %	0	≃0,5	25	37,5	50	75	87,5	100
intégration automat. → unités Vernon	valeurs absolues	pic 1	81	75	79	77	77,5	75	68	–
		pic 2	134	132	134	131	132,5	127	133	–
		1+2	215	207	213	208	210	202	201	201
	valeurs relatives	pic 1	37,5	36,2	37,1	37	37	37,1	33,8	–
		pic 2	62,5	63,8	62,9	63	63	62,9	66,2	–
		1+2	100	100	100	100	100	100	100	100
intégration manuelle → mm²	valeurs absolues	pic 1	371,2	382	385	371,2	392	451	–	–
		pic 2	647,5	647	657	693,5	703	645,2	–	–
		1+2	1018,7	1029	1042	1064,7	1025	1096	–	1045,2
	valeurs relatives	pic 1	36,4	37,2	36,9	35	35,8	41	–	–
		pic 2	63,6	62,9	63,1	65	64,2	59	–	–
		1+2	100	100	100	100	100	100	–	100

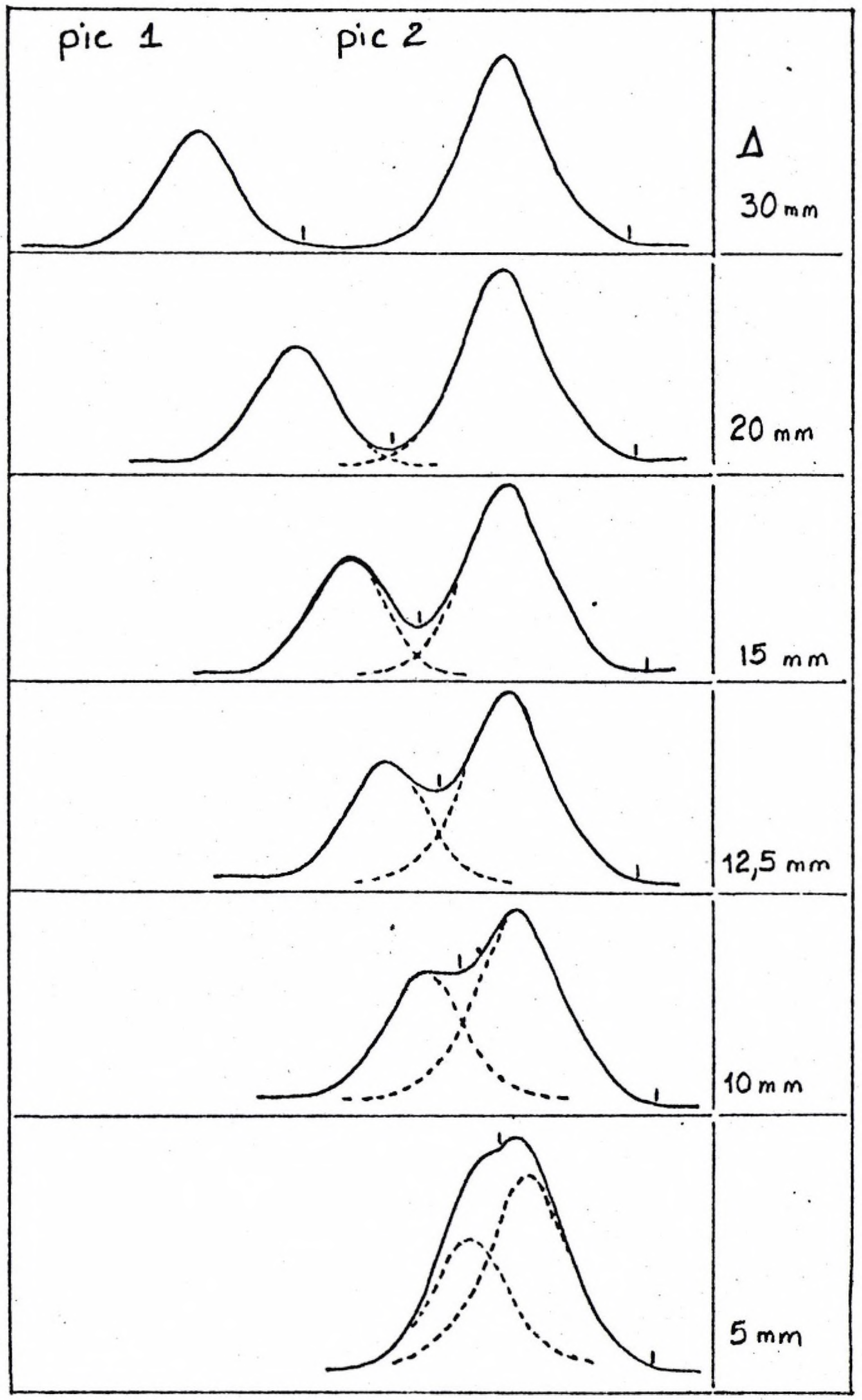


fig. 3 a. Enregistrements de 2 pics : influence du chevauchement (cf p. IV-6)
Intégration automatique

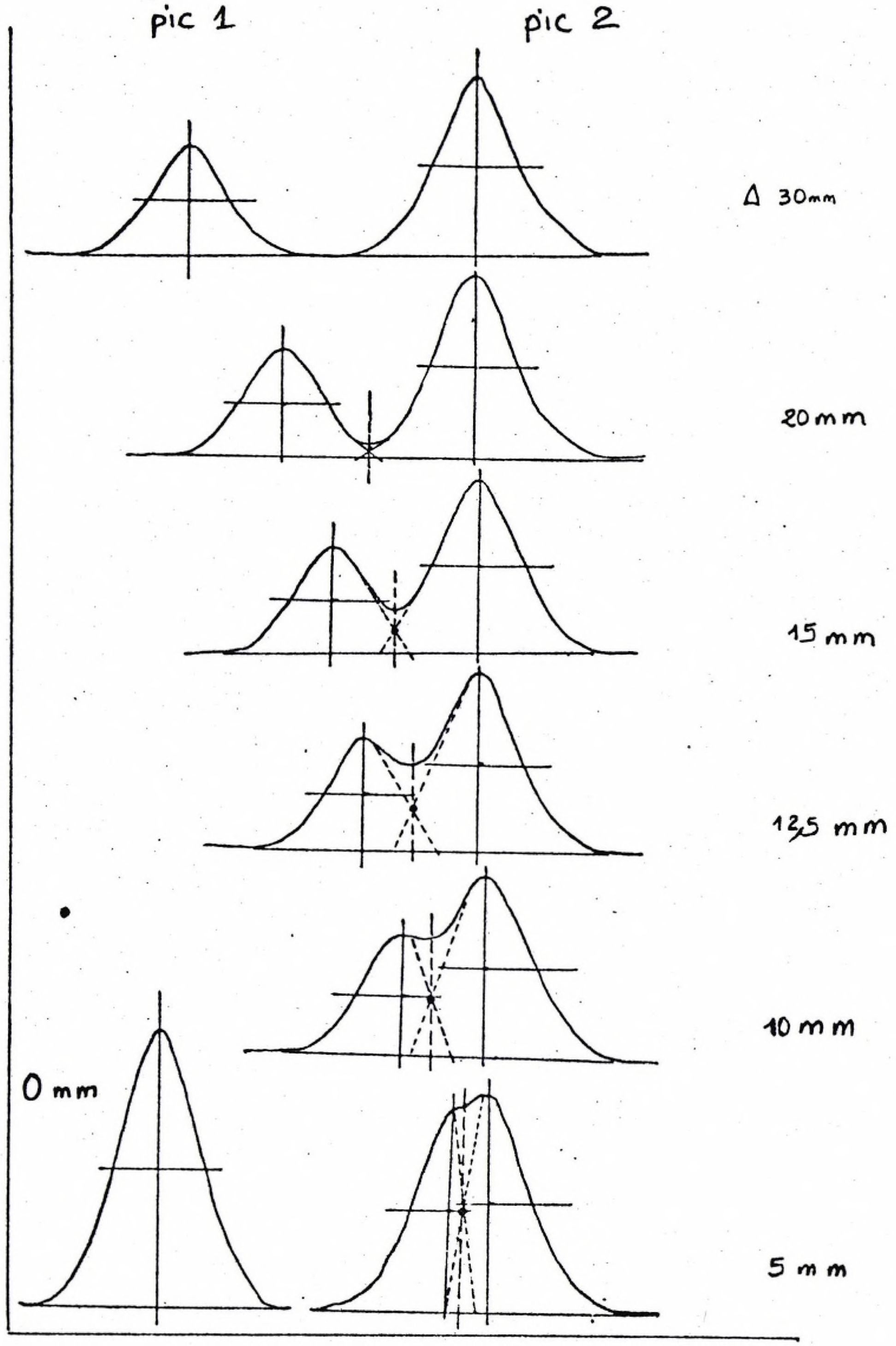


Fig. 3 b. Intégration manuelle
(influence du chevauchement des pics)
(cf. p. IV-6)

L'examen des résultats montre que dans les cas les plus défavorables, l'erreur relative maximale atteint 13% en valeur absolue et 10% en valeur relative par intégration automatique, 18% en valeur absolue et 12% en valeur relative par intégration manuelle.

Pour des pics ne subissant pas plus de 50% de chevauchement, la précision des mesures reste très bonne : de l'ordre de 1 à 5% selon les cas. (La détermination du sommet des pics et de leur point d'intersection est un facteur important d'erreur : elle doit être opérée sur l'enregistrement conjointement avec un repérage direct sur le chromatogramme).

Les résultats figurant dans le tableau 1 sont illustrés par les fig. 3a et 3b montrant les divers enregistrements (3a) ayant donné lieu à intégration automatique, ainsi que les constructions correspondantes (3b) tracées lors de l'intégration manuelle.

CHAPITRE IV (suite)

Deuxième Partie :

RESULTATS D' APPLICATIONS

① Analyse des glucides libres de l'hémolymphe au cours du développement de l'Abeille noire.

Les travaux réalisés au cours du semestre portent sur deux colonies de race noire sélectionnée (Ruches 635 et 767). Le Tableau 1 ci dessous indique le bilan des résultats.

Tableau 1. Glycémie moyenne chez l'Abeille noire à divers stades.
(Moy. = moyenne ; S = Ecart-type de l'échantillon ; N = nombre de mesures)

stades	Tréhalosémie (mM)			Glycémie (mM)			Fructosémie (mM)		
	Moy.	S	N	Moy.	S.	N	Moy.	S	N
L 4	30,8	8,2	5	15,3	10,6	5	2,8	3,8	5
L 5	48,0	8,7	3	3,1	0,2	3	1,5	0,4	3
No	22,7	11,9	6	16,1	10,3	6	0,07	0,03	4
N1*	24,4	...	3	18,6	...	3	0	...	3
N2	18,7	4,3	5	9,4	5,2	5	0,46	0,56	5
N3*	30,4	4,8	3	52,5	9,9	3	0,67	0,39	3
N5	45,0	17,0	11	8,1	5,4	11	0,13	0,14	8'
Ao*	42	-	1	6,8	-	1	0,4	-	1
A1	43,2	16,3	7	6,0	2,0	7	3,2	2,3	7
Ab.	14,1	4,1	14	19,5	6,1	14	6,3	4,5	14

* Résultats incomplets (1 seule colonie)

② Influence du nourrissement sur la glycémie d'Abeilles élevées en cagettes depuis la naissance.

Des Abeilles naissantes sont prélevées par lots de 50, ~~et~~ placées en cagettes garnies de cire, et nourries artificiellement au moyen de solutions sucrées. Le tableau 2 indique la glycémie déterminée dans les différents cas.

Tableau 2 _ (Moyennes, Ecarts-types et Nombre de mesures _)

Sucres de l'Hemo-lymphe mM		Saccharose 100 % 8 jours	Saccharose 100 % 15 jours	Saccharose 10 % 8 jours	Glucose 80 % 8 jours	Glucose 80 % 15 jours	Sacch. 100 % 15 j puis Glucose 80 % 4 jours
Polyholoside	Moy.	24,6	11,2	—	1,44	—	—
	s	11,6	2,5	...	0,9	...	...
	N	2	2		2		
Trehalose	Moy.	40,1	80	33,9	48,4	49,2	78,8
	s	9,6	14,1	0,6	1,7	6,9	0,6
	N	5	2	3	2	3	2
Saccharose	Moy.	73,0	11,0	4,8	5,3	0,3	0
	s	60,2	5,4	3,5	6,1	0,28	...
	N.	5	2	3	2	3	
Glucose	Moy.	61,0	38,0	9,0	128	19,1	30,8
	s	21,8	10,1	0,35	110	19,5	2,8
	N.	5	2	3	2	3	2
Fructose	Moy.	76,6	73,3	15,5	3,6	0,7	6,8
	s	17,7	32,1	1,1	2,5	0,3	0,6
	N.	5	2	3	2	3	2

Par ailleurs, les sirops synthétisés par les Abeilles ont été analysés comparativement dans le cas des élevages sur glucose et sur saccharose concentrés (15 jours).

Tableau 3 - Concentration en sucres (mM) dans le sirop prélevé dans l'Abdomen des Abeilles élevées sur Saccharose 100 % et Glucose 80 % pendant 15 j

Nourrissement	[Polyholoside]	[Tréhalose]	[Sacchar.]	[Glucose]	[Fructose]
Saccharose 100 % -	1440	208	3744	2368	3936
Glucose 100 %	25,6	48	27,2	2848	96

L'ensemble des résultats sera analysé d'une manière plus approfondie dans les semaines à venir. Toutefois, il se dégage l'impression que les sirops de saccharose à 100 % induisent des concentrations glucidiques extrêmement déséquilibrées dans l'hémolymphe des insectes, avec excès de saccharose, bien entendu, mais également de fructose, de tréhalose et d'au moins un poly-holoside à 2 ou 3 unités C6. Une régulation paraît intervenir après 15 jours d'élevage. La nécessité d'un nourrissement avec 100 % de saccharose pourrait être discutable, selon les objectifs du traitement.

③ Etude préliminaire des glucides dans le puceron : Myzus persicae.

• Etude des solvants d'extraction

Le Tableau 4 indique les principaux résultats obtenus avec 3 types de solvants d'extraction. Les pucerons ont été prélevés sur feuilles de pêchers. Les broyages dans les solvants ont été effectués au moyen de micro-Potters fabriqués au laboratoire (cylindres ⌀ 2 mm, Longueur 20 à 25 mm). Un premier lot a été ainsi traité aussitôt et les suivants après conservation 12 H au congélateur.

Le spectre glucidique complet comprend au moins 12 composants dont les 4 principaux ont été identifiés (ci dessous).

Tableau 4. Les glucides de pucerons : n moles / mg de poids frais

Mode d'extraction	Trehalose Moy.	(Ecart type)	Saccharose Moy.	(s)	Glucose Moy.	(s)	Fructose Moy.	(s)	N
Ethanol-eau (1-1) sur animaux frais.	8,6	(6,1)	2,6	(0,9)	68,0	(4,2)	1,8	(0,5)	4
Ethanol-eau (1-1) sur animaux conservés 12 H au congélateur	1,4	(0,03)	0,95	(0,57)	57,5	(12,5)	1,7	(0,2)	2
Eau distillée (12 H congélation avant extraction)	4,7	...	1,9	...	77	...	1,4	...	1
Ethanol pur (12 H congélation avant extraction)	6,25	(0,35)	0,85	(0,64)	50,5	(4,95)	1,72	(0,39)	2

La conservation au congélateur n'entraine pas de très grandes différences dans le dosage du glucose ni celui du fructose. (les autres présentent une variance élevée entre 2 lots)

L'eau est meilleur extracteur pour le glucose que l'éthanol, mais celui ci, grâce à l'élimination de la majeure partie des macromolécules protéiques, conduit à l'obtention d'un extrait plus pur, sans mélanisations, et donnant des séparations beaucoup plus fines.

• Effets du jeûne.

A l'occasion de l'étude des pucerons secs, la pyridine a été également essayé comme solvant d'extraction.

Tableau 5 – Analyse des glucides de pucerons secs(*)
(nmoles/mg poids sec et/mg poids frais)
Les animaux ont jeûné pendant 4 jours avant extraction – N = 3 déterminations –

	Tréhalose	Saccharose	Glucose	Fructose
Solvant : Ethanol-eau (1-1)				
nmoles/mg sec	5,5	2,9	60	3,4
nmoles/mg frais	1,2	0,6	13,2	0,75
Ethanol-eau-pyridine (1-1-1)				
nmoles/mg sec	36,5	6,4	52,5	6,0
nmoles/mg fras	8,0	1,4	11,56	1,3

* Poids sec = 22% du poids frais.

La pyridine, excellent solvant des sucres, permet au solvant alcoolique d'éliminer encore une grande partie des protéines par floculation, et assure, en même temps, une meilleure extraction du tréhalose, du saccharose et du fructose.

L'effet du jeûne s'est essentiellement traduit par une consommation des réserves de glucose libre.

Lors d'expériences en liaison avec d'autres chercheurs, le transit des animaux à analyser pourra être opéré à partir de lots ayant été lyophilisés.

(4) Analyse des sucres dans les miels et miellats

Dans le cadre d'un contrat avec EDF, une série d'échantillons provenant des environs de la centrale de Fessenheim a été analysée. Les détails figurent dans un rapport séparé. Le Tableau 6 indique les résultats "bruts" exprimés en unités biochimiques normalisées, soit : micro moles par mg de miel ou de miellat frais.

Tableau 6. Glucides des miels et miellats. {AL = Orig. Allemande ; FR = Orig. Française}

Echantillons - nos	Raffinose + Mélibiose	Maltose + Gentiobiose	Iso-maltose	Saccharose	Glucose	Fructose
Miels toutes fleurs :						
FR 1	0,05	0,11	0,10	0,06	2,06	2,15
FR 3	0,04	0,1	0,08	0,06	1,75	1,85
FR 5	0,04	0,1	0,09	0,025	1,92	1,74
FR 6	0,05	0,11	0,07	0,035	1,92	1,74
FR 8	0,04	0,09	0,09	0,06	1,92	1,86
FR 8a	0,...	0,071	0,062	0,042	2,0	1,85
FR 12	0,08	0,15	0,14	0,10	1,57	1,77
FR 15	0,03	0,09	0,06	0,067	1,82	1,92
FR 16	0,026	0,10	0,075	0,067	1,91	1,92
FR 24	0,040	0,12	0,12	0,068	1,62	1,83
FR 27	0,040	0,10	0,075	0,060	1,58	1,86
FR 28	0,034	0,10	0,62	0,053	1,72	1,77
FR 29	0,034	0,087	0,062	0,053	1,87	1,83
FR 31	0,027	0,077	0,067	0,057	2,1	1,87
FR 33	0,027	0,058	0,067	0,079	2,14	1,98
FR 34	0,185	0,135	0,115	0,071	1,61	1,65
FR 35	0,065	0,144	0,115	0,10	1,55	1,80

Tableau 6 - suite -

Echantillons	n°s	Raffinose + Melibiose	Maltose + Gentiobiose	Iso-maltose	Saccharose	Glucose	Fructose
Miels toutes fleurs (suite) :							
	AL 5 ...	...	0,13	0,145	0,070	2,0	2,24
	AL 7	0,047	0,125	0,112	0,05	1,50	2,1
	AL 11	0,086	0,162	0,162	0,07	1,51	1,91
Miels Colza + Tilleul :							
	FR 30 ...	0,054	0,106	0,106	0,093	1,86	1,75
	FR 32 ...	0,027	0,067	0,077	0,057	1,98	1,61
Miels de Colza :							
	FR 4 ...	0,030	0,090	0,071	0,042	1,81	1,85
	FR 10 ..	0,065	0,10	0,125	0,117	1,90	2,05
	FR 14 ..	0,04	0,087	0,075	0,033	1,94	1,95
	AL 2 ...	0,...	0,11	0,10	0,05	1,83	2,17
Miellats de Sapin :							
	FR 20 ..	0,105	0,20	0,15	0,083	1,46	1,76
	FR 22 (*) ..	0,125	0,175	0,15	0,091	1,31	1,62
	FR 23 (*) ..	0,113	0,175	0,125	0,076	1,38	1,63
	AL 1 ...	0,133	0,16	0,16	0,10	1,40	1,92
	AL 3 ..	0,116	0,16	0,16	0,085	1,50	1,96
	AL 4 ...	0,125	0,16	0,14	0,085	1,60	2,10
	AL 6	0,133	0,17	0,145	0,095	1,44	1,73
	AL 8	0,153	0,20	0,175	0,07	1,42	1,63
	AL 9	0,21	0,21	0,21	0,12	1,36	1,66
	AL 10	0,187	0,22	0,21	0,11	1,22	1,54

(*) Mélange avec Miel de Chataîgners -

CHAPITRE V

SUR LA RÉGULATION DU FONCTIONNEMENT DES α - GLUCOSIDASES (1) ET DE LA GLYCÉMIE CHEZ L'ABEILLE NOIRE

Sommaire :

INTRODUCTION.

A - Bref rappel de quelques résultats obtenus en 1974

B - Méthode de calcul des paramètres cinétiques dans le cas d'une réaction d'ordre $n \neq 1$

C - Paramètres cinétiques déterminés sur la colonie 635

D - Paramètres cinétiques déterminés sur la colonie 767

E - Discussion : Analyse mathématique du mécanisme d'inhibition des α glucosidases par le Glucose

F - Applications à l'étude du nourrissement

G - Recherches sur la stabilité de la glycémie

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

(1) - Classification internationale : E.C. 3-2-1-20

INTRODUCTION

Les recherches effectuées en 1974 sur les α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles ont permis de procéder à une première détermination des paramètres cinétiques (1) aux divers stades du développement et de mettre en évidence les propriétés inhibitrices du glucose et celles du Saccharose.

Les travaux réalisés au cours du printemps 1975 ont eu pour objectif d'approfondir l'analyse des paramètres cinétiques de l'enzyme fonctionnant d'une part dans les conditions naturelles et d'autre part en présence de fortes concentrations en glucose, afin de mieux comprendre le mécanisme de l'inhibition et d'aborder l'étude des moyens éventuels de régulation de la glycémie chez l'Abeille.

Les paramètres d'activité de l'enzyme ont été ensuite analysés chez des Abeilles élevées artificiellement en cagettes au moyen de sirops de saccharose ou de glucose, dans le but de rechercher l'existence éventuelle de mécanismes d'induction ou de répression.

Grace aux progrès accomplis en début d'année au niveau des microméthodes, il a été possible d'analyser la glycémie dans les prélèvements destinés aux analyses enzymologiques, ce qui confère aux relations dégagées une valeur d'autant plus solide.

Pour des raisons d'homogénéité physiologique, la suite de ce travail sera abordée en 1976 à la même période de l'année (d'avril à juin).

(1) Substrat employé : p. Nitro Phényl-α-D Glucopyranoside (Merck)

A - BREF RAPPEL DE QUELQUES RESULTATS OBTENUS EN 1974 -

La vitesse maximum VM (n.moles de substrat consommé par mn par 1 µl d'hémolymphe) et la constante d'affinité Enzyme-Substrat (mM) ont été calculées, ainsi que la concentration en glucose (mM) entraînant une diminution de moitié de la vitesse de réaction, pour une [Substrat] fixe. Les paramètres V_M^i et K^i mesurés en présence d'une forte [glucose] sont également indiqués dans le tableau 1 ci dessous - Les concentrations de glucides préexistant dans l'hemolymphe ont été mesurées sur des Abeilles de la même colonie à quelques jours d'intervalle.

Tableau 1 - Résumé des résultats obtenus en 1974 sur la colonie 767

Paramètres :	Larves entre 4e et 5e st.	Nymphes yeux blancs	Nymphes y. marrons	Nymphes corps brun	Naissantes —	Butineuses
V_M	0,13	1,25	3,0	2,3	0,7	9,96
V_M^i	0,13	---	---	0,80	0,59	8,0
K	3,4	2,0	2,0	2,0	3,2	3,80
K^i	11,0	...	...	6,2	12,1	9,5
[Gl] → $v_0/2$ ..	60	...	...	80	50	80
Tréhalose ...	38,3	23,7	26,2	43,1	60,1	29
Glucose ...	7,5	17,2	15,2	42,5	8,1	52,6
Fructose ...	+	0,5	0,9	1,0	5,4	30,9

Une analyse plus approfondie des paramètres d'inhibition est en cours à partir des données numériques obtenus en 1974, grace aux progrès accomplis cette année dans les méthodes de calcul.

A signaler plus particulièrement chez les adultes : l'ordre de la réaction : 5 fois supérieur à 1 sur 6 séries de déterminations ! ($\overline{n}$ = 1,15)

- 2 déterminations sur extraits d'hémolymphe + organes abdominaux :

  1) n = 0,964
  2) n = 1,115

- 4 déterminations sur hémolymphe pure dont la 4e en présence de 20 mM de saccharose in vitro :*

  1) n = 1,10
  2) n = 1,05
  3) n = 1,263
  4) n = 1,393 *

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a permis de mettre en évidence les principales fractions actives et d'estimer leur P.M..

Tableau 2. P.M. estimé des fractions dominantes d'activité α-glucosidasique observées à divers stades

	Classes de Poids Moléculaire		
stade :	PM 350 000	PM 250 000	PM 190 000
Larves 5e st.	+ ++	++	+
Nymphes	(+)	...	++++
Naissantes	++	...	+
Butineuses	+	...	+++

La fig. 4 illustre ces résultats, comparativement aux fractions protéiques totales.

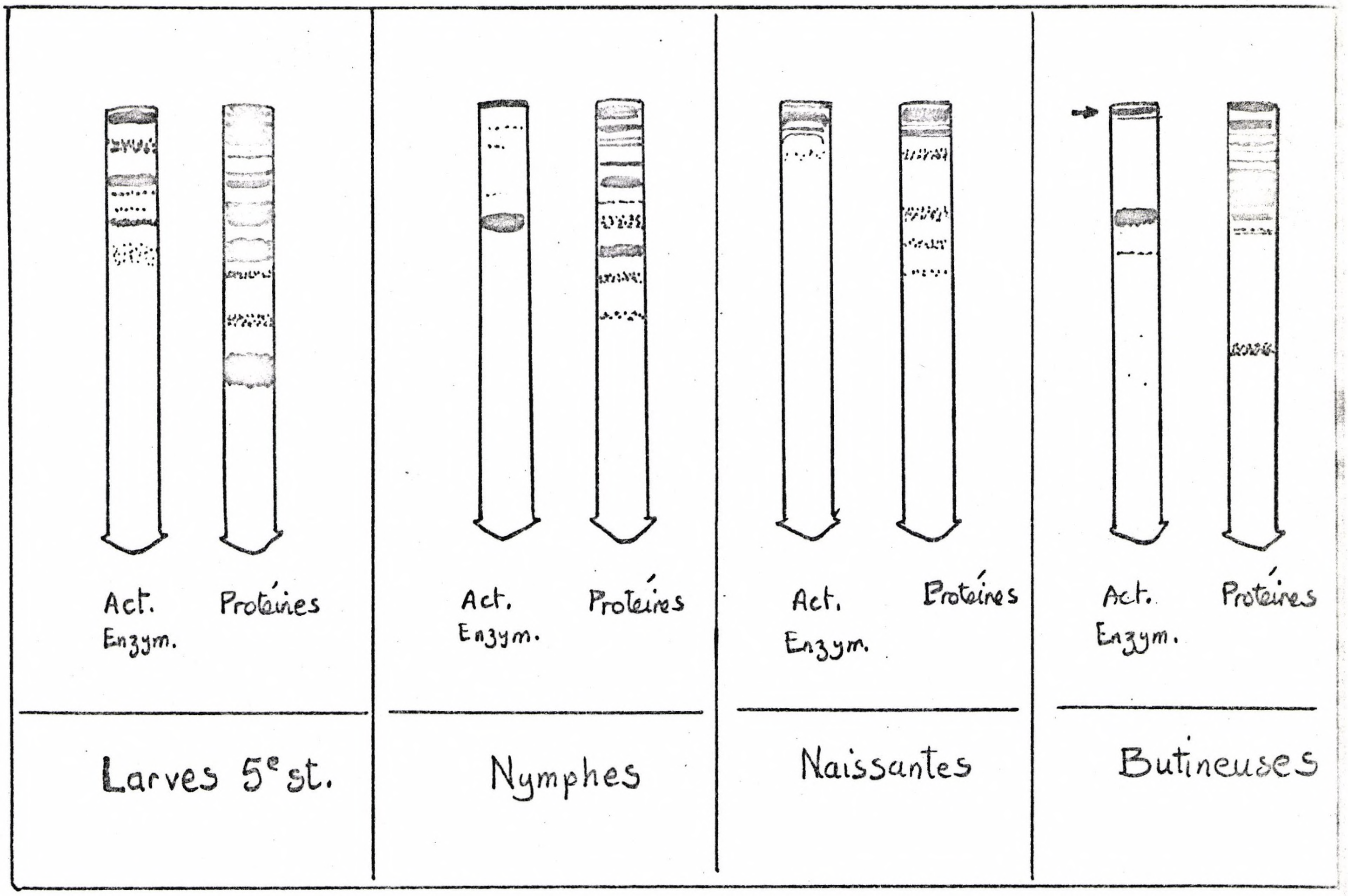


Fig. 4- fractions présentant une activité α-glucosid[illegible] (système β Naphtol-NBT) comparées aux fractions protéiques séparées au cours d'une même [illegible] d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (G.N.).

B - METHODE DE CALCUL DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES

• Position du problème -

La détermination de la vitesse maximum VM n'est pas réellement possible par voie directe : il s'agit d'une valeur asymptotique et les concentrations en substrat assez élevée pour en donner une approche suffisante sont parfois incompatibles avec la solubilité du produit -

VM est généralement déterminé par l'extrapolation de la droite de Lineweaver et Burk : $\frac{1}{v} = \frac{1}{VM} + \left(\frac{K}{VM}\right) \cdot \frac{1}{S}$

Or, ce calcul est faux chaque fois que l'ordre de la réaction n'est pas égal à 1, comme va le montrer la démarche analytique suivante, basée au départ sur un exemple concret repris par voie théorique

• Exemple étudié .

Il s'agit d'Abeilles de la colonie 767 en fin de stade Nymphal, prêtes à se Transformer en individus ailés dans un délai de quelques mn.

L'extrait d'hémolymphe, conservé à 26° pendant 160 mn avant l'expérience présentait les glycémies suivantes : (N=18 animaux)

Temps zéro :	Glucose 7,3 mM	Tréhalose 45 mM
Temps To + 160 mn* :	103 mM	26 mM

- Valeurs mesurées in vivo sur 7 lots de 3 nymphes chacun, prélevés au cours de l'expérience : Tréhalose : 59,3 mM (Δx = 14,3)
Glucose : 6,6 mM (Δx = 3,42)

(*) Voir § G -

Tableau 3 - Vitesses de réaction mesurées pour différentes concentrations en Substrat (2 mesures pour chaque point)

Substrat (mM)	Vitesse initiale nmoles/mn/µl	S^{-1}	v^{-1}
0,6	0,154	1,667	6,494
1,2	0,268	0,833	3,731
3	0,545	0,333	1,835
6	0,820	0,167	1,220
9	0,880	0,111	1,136
12	0,950	0,083	1,053
18	0,988	0,056	1,012

La courbe directe $v = f(S)$ et la courbe des inverses $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ sont tracées sur la fig. 5 : manifestement, celle-ci n'est pas droite tandis que la première présente une allure très classique ...

L'analyse de la courbe a donc été effectuée dans le cas d'une réaction d'ordre n selon l'équation transformée de HILL :

$$\log \frac{v}{V_M - v} = n . \log S - \log K$$

(à partir de l'équation générale : $v = \frac{V_M . S^n}{K + S^n}$)

Le calcul de la vitesse maximum a été réalisé à partir de l'extrapolation — non point de la droite des inverses in toto — mais des points les plus proches de l'asymptote, c'est à dire les plus proches de $\frac{1}{S} = 0$ sur la droite des inverses -

pour N = 4 points : { corrélation $\rho = 0,991$; droite de régression : $\frac{1}{v} = 1,925 . \frac{1}{x} + 0,905$ }

d'où $V_M = 1,105$ nmoles/mn/µl et $K = 2,12$ mM

...

Fig. 5

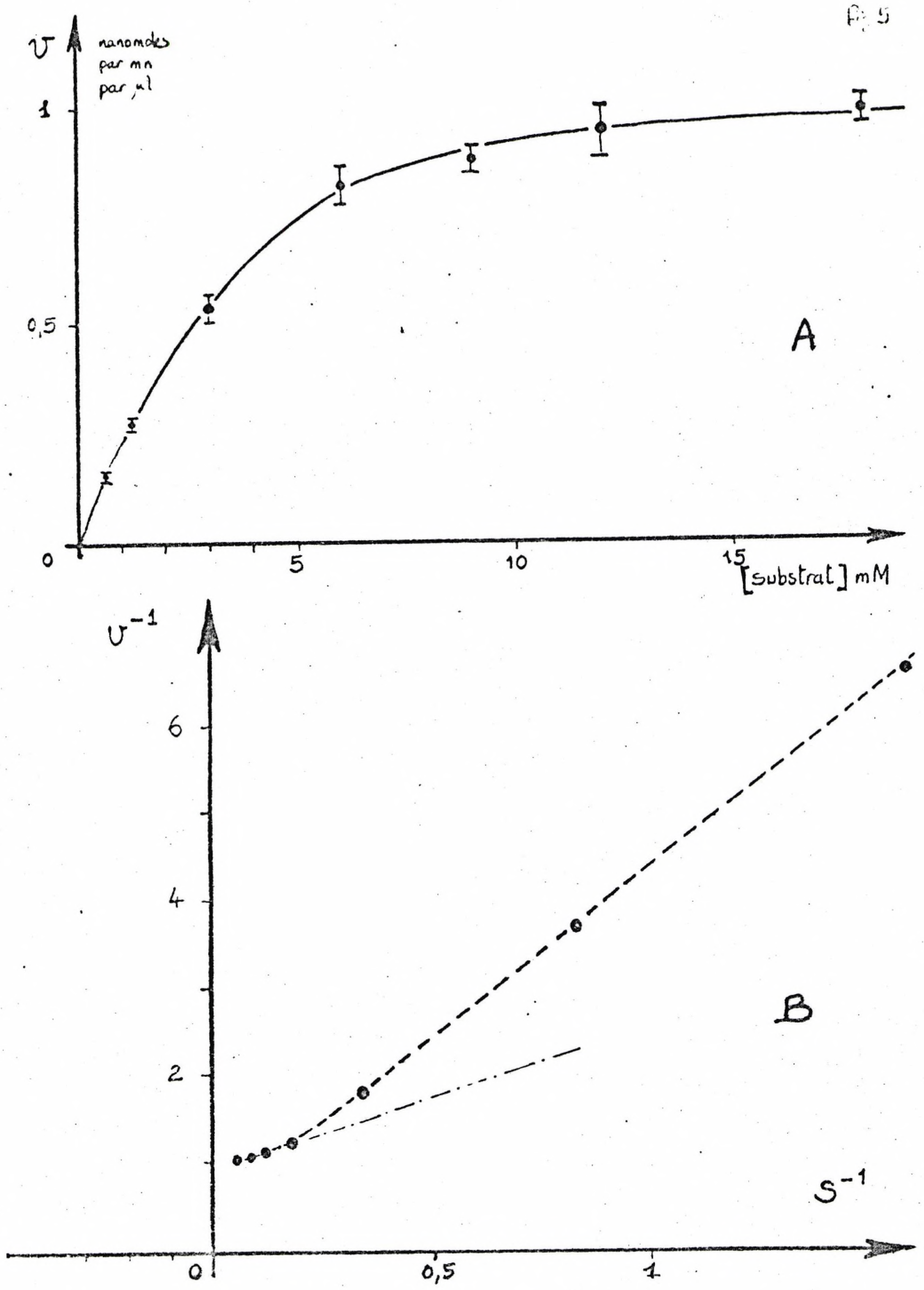


fig. 5 : A - Courbe directe
B - Courbe des inverses

La détermination de V_M permet de calculer l'expression $\log \frac{v}{V_M - v}$ (appelée dorénavant expression de HILL et notée en abrégé : H) et la droite de régression de H sur log S. Le résultat est le suivant :

corrélation $\rho = 0,998$

Equation de régression : $H = 1,21 \log S - 0,551$

c'est à dire : $n = 1,21$

$K = 3,55$ (fig. 6)

Ainsi, la mesure de l'ordre de la réaction laisse prévoir la possibilité d'une coopérativité positive entre l'enzyme et le substrat, alors que la courbe directe ne présente pas une allure sigmoïde (allostérie) -

L'étude théorique suivante va montrer que cette figure graphique n'est pas une critère absolu de la cinétique d'ordre > 1.

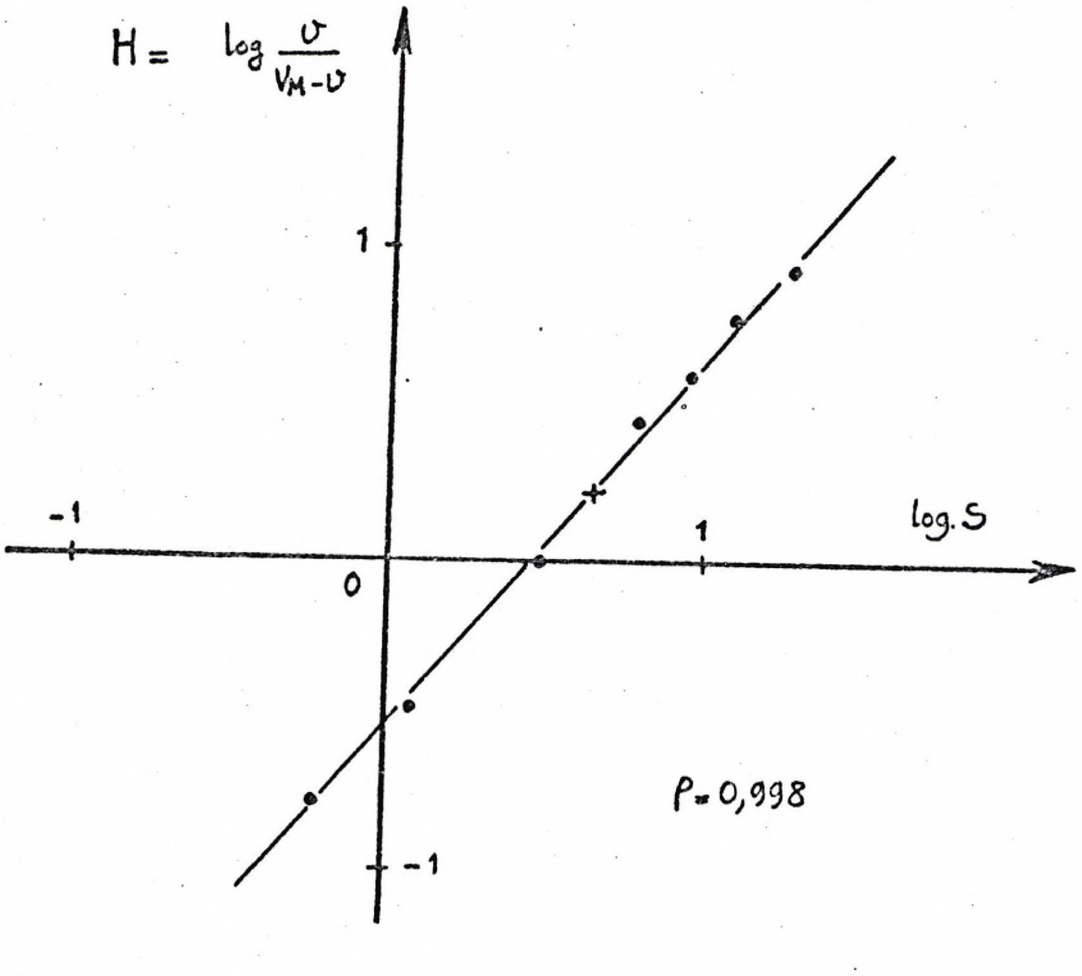


Fig 6 : Droite de HILL

Etude théorique d'une courbe d'ordre n, dans les cas où n>1 ; n=1 ; n<1.

Grace à un programme établi sur calculatrice HP65, le calcul $v = f(S)$ a été exécuté à partir de l'équation générale directe $v = \frac{V_M \cdot S^n}{K + S^n}$ dont les paramètres V_M et K ont été assimilés à ceux déterminés chez l'Abeille : $V_M = 1,1$ K = 3,5, avec ▶ n = 1,21 ▶ n = 1,0 ▶ n = 0,8.
3 Equations ont été ainsi utilisées et les résultats homologues de ceux déterminés expérimentalement sont indiqués ci dessous.

Tableau 4 - Calcul de v en fonction de S dans 3 cas théoriques comparés aux points expérimentaux

S mM	$v = \frac{1,1\ S^{1,21}}{3,5 + S^{1,21}}$ (ordre 1,21)	$v = \frac{1,1\ S}{3,5 + S}$ (ordre 1)	$v = \frac{1,1\ S^{0,8}}{K + S^{0,8}}$ (ordre 0,8)	v expérimentale (rappel)
0,6	0,147	0,161	0,176	0,154
1,2	0,289	0,281	0,273	0,268
3,0	0,571	0,508	0,448	0,545
6,0	0,785	0,695	0,600	0,820
9,0	0,883	0,792	0,686	0,880
12	0,938	0,852	0,744	0,950
18	0,995	0,921	0,817	0,988
∞	1,10	1,10	1,10	...

La courbe expérimentale coïncide très bien avec la cinétique d'ordre 1,2, et ceci bien que le premier point expérimental soit un peu élevé : CE N'EST PAS LE DÉBUT DE LA COURBE DE SATURATION QUI TÉMOIGNE DE L'ORDRE DE LA RÉACTION MAIS LA FORME GÉNÉRALE, Y-COMPRIS POUR LES FORTES [SUBSTRAT] !

La fig. 7 montre les 3 cas de courbes des inverses déterminés par voie théorique. Il se confirme effectivement que le calcul de V_M d'après V_M^{-1} obtenu graphiquement n'est valide que si $n = 1$. Dans les autres cas, V_M^{-1} coïncide avec la tangente ou dérivée à l'origine des courbes ($n > 1$) et ($n < 1$), ce qui montre bien qu'une extrapolation linéaire à partir des toutes premières valeurs (pour les fortes concentrations en substrat) peut seule donner une bonne estimation de la vitesse maximum. (Une erreur sur V_M entraîne une mauvaise détermination de n).

Le calcul de la droite de régression a été effectué dans divers cas correspondant à des points de plus en plus rapprochés de $S = 0$: (cas où $n = 1,21$), au moyen des valeurs homologues de celles déterminées expérimentalement.

- pour l'ensemble : N = 9 points : corrélation $\rho = 0,997$
  Régression $y = 3,59\,x + 0,683$
  soit $V_M = 1,46$ et $K = 5,26$

  N = 5 points : corrélation $\rho = 0,999$
  Régression $y = 2,43\,x + 0,866$
  soit $V_M = 1,15$ et $K = 2,80$

Pour une extrapolation de $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ correspondant aux points expérimentaux obtenus aux concentrations S supérieures aux $\frac{2}{3}$ de K, la détermination de V_M s'écarte ici de $\frac{0,05}{1,10}$ soit + 4,5 % de la valeur réelle ($\frac{2}{3}$ de K correspond à $\frac{1}{3}\,V_M$).

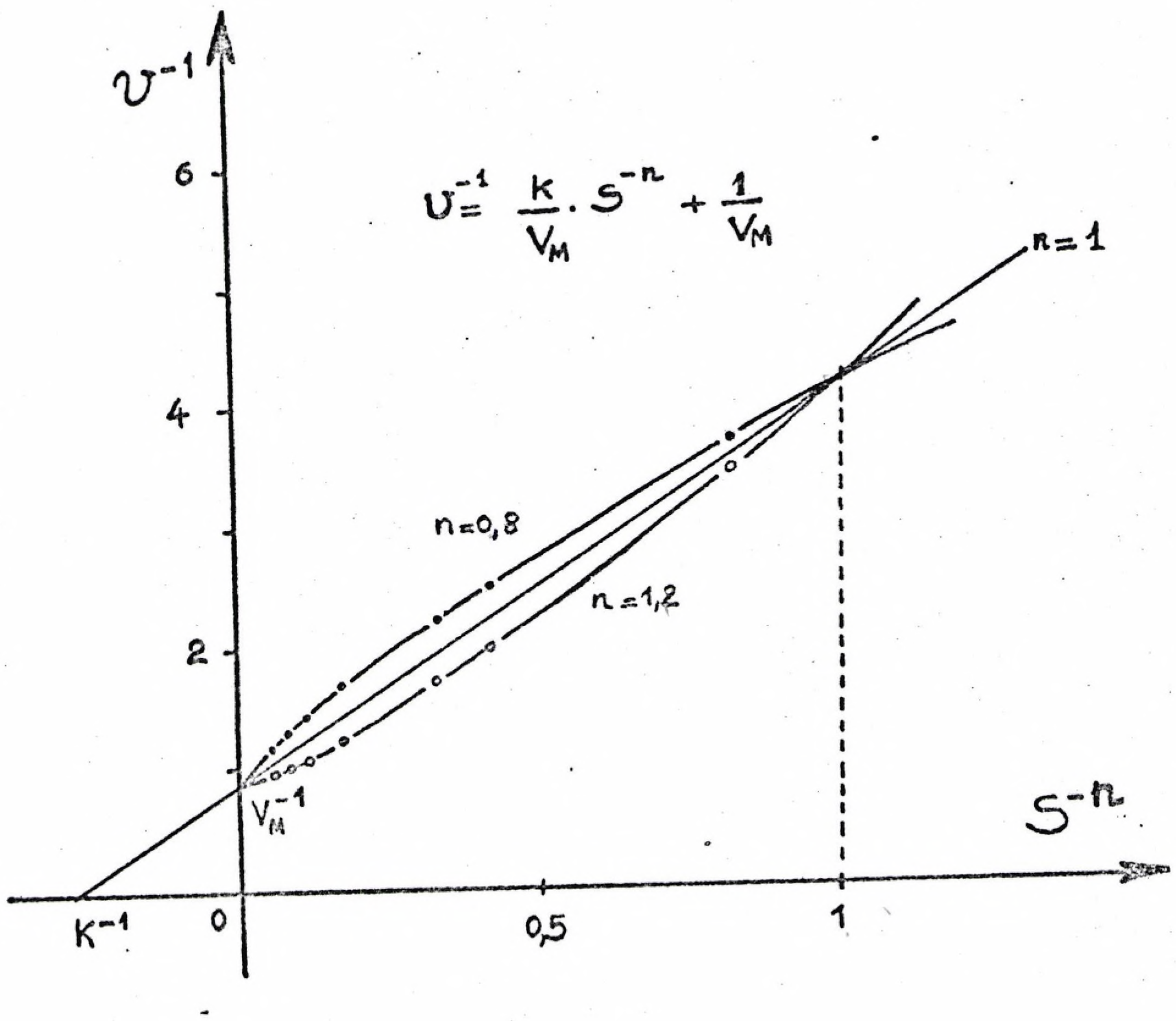
LA CONSTANTE Km mesurée ainsi reste <u>fausse</u> et ne peut être déterminée avec précision qu'au moyen de l'équation de HILL.

fig. 7 : Courbes $v^{-1} = f(S^{-n})$ calculées par voie théorique dans 3 cas : $n = 1$

$n > 1$

$n < 1$

fig. 7



• Conclusions

Ce résumé de l'étude théorique effectuée sur le mode de calcul des paramètres d'activité enzymatique aboutit à plusieurs conclusions, en particulier les suivantes :

1) Une courbe d'ordre $n > 1$ n'est pas forcément sigmoïde ...

2) Le calcul de la vitesse maximum VM étant faux d'après extrapolation de l'ensemble de la droite des inverses si l'ordre de la réaction (encore indéterminé à ce stade du calcul) n'est pas exactement égal à 1, il convient d'utiliser seulement les points situés au voisinage de l'asymptote pour obtenir une bonne détermination au moyen de l'équation de régression de $\frac{1}{v}$ sur $\frac{1}{S}$. (En particulier, les valeurs de v correspondant aux valeurs inférieures à $\frac{1}{3}$ de VM apparent sont à proscrire)

3) La détermination de la constante K n'est rigoureuse que lorsqu'elle est effectuée au moyen de l'équation de HILL si n est différent de 1. (si $n = 1$ les 2 méthodes donnent très exactement le même résultat).

• On propose donc d'appeler K la constante d'affinité ainsi menée, Km étant réservé à la constante de Michaelis (cas $n = 1$). (voir § E : variantes de K)

Dans tout ce qui suit, tous les calculs ont été systématiquement effectués selon la démarche qui vient d'être proposée.

C. PARAMÈTRES CINÉTIQUES DÉTERMINÉS SUR LA COLONIE 635

Sur cette colonie, les concentrations molaires de sucres dans l'hémolymphe ont été effectuées généralement le même jour que les essais enzymatiques, mais sur des Abeilles de même stade, prises sur le même rayon, et non sur des prélèvements de l'extrait utilisé pour l'enzymologie, comme cela a pu être réalisé par la suite sur la colonie 767.

Les Paramètres ont été déterminés aux stades suivants :

- Larves en début de 5e stade (L 4/5)
- Nymphes blanches - yeux blancs (No)
- Nymphes blanches - yeux marrons (N2)
- Nymphes brunes (N5)
- Abeilles naissantes (A·1)
- Abeilles butineuses (Ab)

• Note sur les prélèvements :

L'hémolymphe est ponctionnée dans le vaisseau dorsal des insectes au moyen de microseringues Hamilton (précision ± 1%) et introduite dans des tubes de 1 à 3 mm Ø selon les cas et 3 cm de hauteur, sous une couche d'heptane (qui abrite de l'air le liquide et évite les mélanisations). L'ensemble est maintenu tout au long de l'expérience (40 à 60 mn pour une cinétique $v = f(S)$) dans un bain marie à 0 °c

• Conditions d'étude de l'influence du glucose :

La courbe $v = f([\text{Glucose}])$ est étudiée avec $[S] \simeq K$

La courbe $v = f(S)$ en présence de glucose est déterminée avec la [Glucose] donnant $\frac{v_0}{2}$ dans le cas précédent

1° Etude des larves du 5° stade (fig. 8)

Prélèvements sur 5 larves : Poids moyen 104,2 mg par larve
Volume total d'hémolymphe : 250 µl soit 50 µl par larve.

a. Courbe de saturation directe : $v = f(S)$

prises d'essais : 5 µl d'hémolymphe.

Paramètres déterminés : $V_M = 0{,}138$ n moles/mn par µl
$K = 3{,}18$ mM
$n = 0{,}911$

(incertitude relative : 6,4 %)

b. Influence de la conc. en glucose sur la vitesse initiale

conditions de réaction : S = 3,6 mM
Glucose ajouté : de 10 à 200 mM
$\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 60 mM

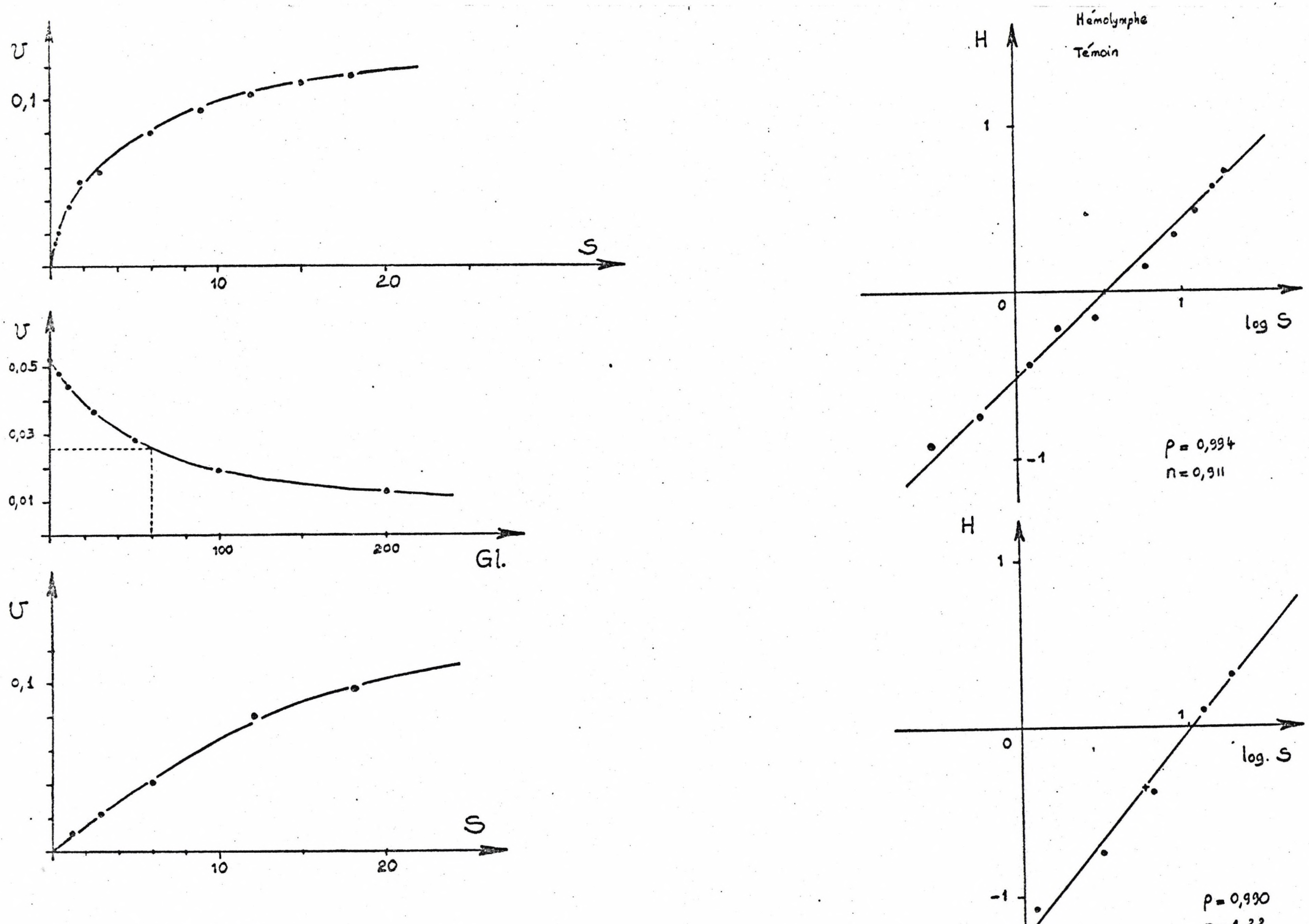
c. Courbe de staturation dans le cas d'inhibition.

prises d'essais 10 µl
Glucose ajouté in vitro : 50 mM
Paramètres mesurés : $V_M = 0{,}14$ nmoles/mn par µl
$K = 18$ mM
$n = 1{,}22$

d. Glycémie mesurée au même stade :

N = 3 mesures. moyennes : mM et (écarts types).

Trehalosémie : 38,30 (4,06)
Glycémie : 7,53 (0,83)
Fructosémie : Traces non dosables.



Larves 5° stade (635)

Fig. 8

2° Etude des Nymphes blanches (No)

(fig. 9)

Prélèvements : 210 µl sur 10 nymphes

(21 µl par nymphe)

a) Courbe de Saturation directe :

Prises d'essais 5 µl.

Paramètres : $V_M = 1,16$ nmoles/mn par µl

$K = 4,57$ mM

$n = 0,743$

b) Influence de la conc. en glucose sur la vitesse initiale.

Conditions d'expérience : S = 3 mM

$\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 110 mM

c) Courbe de saturation avec inhibition

$v = f(S)$ avec 80 mM de glucose ajouté in vitro

Paramètres : $V_M = 1,15$

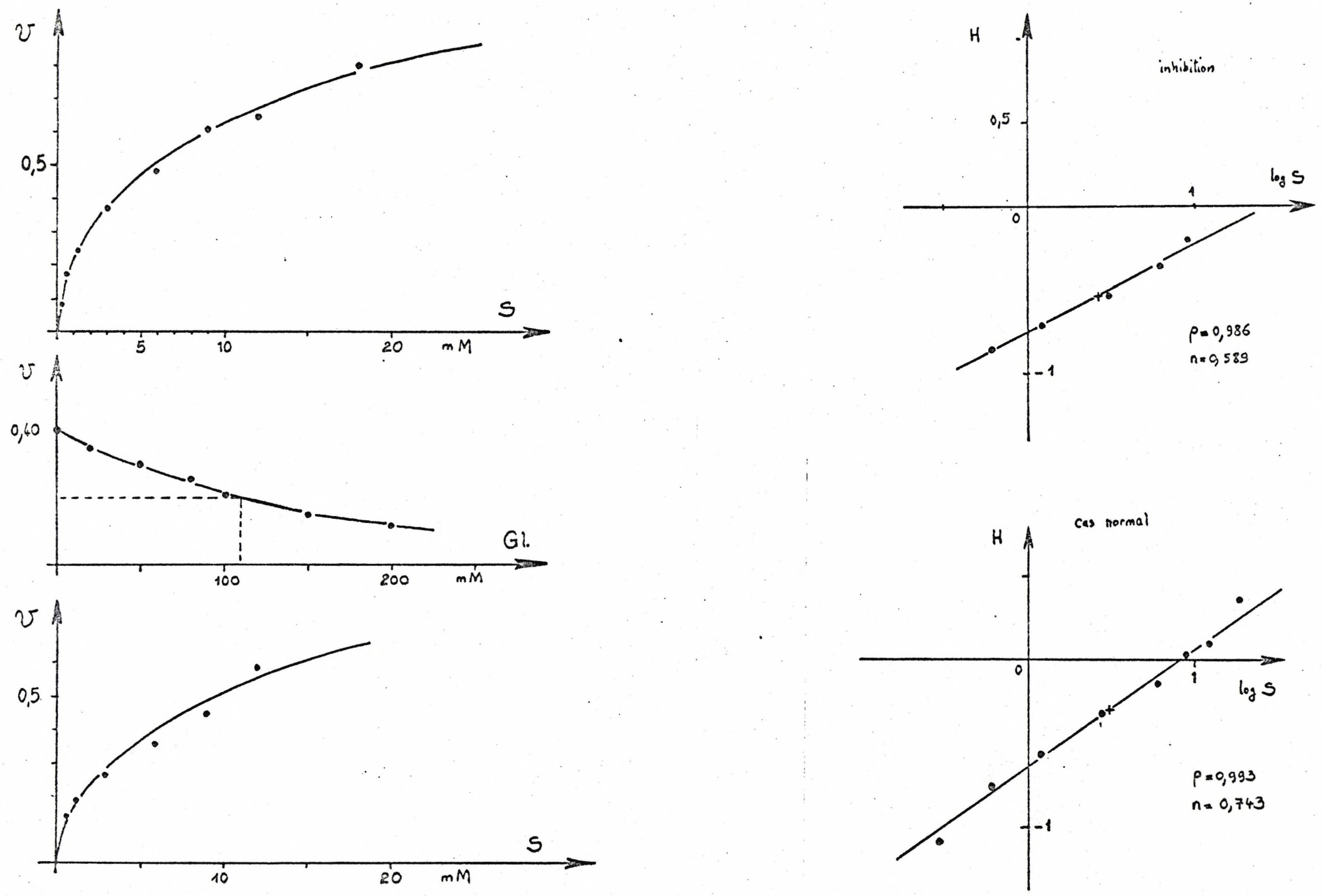
$K = 5,79$

$n = 0,589$

d) Glycémie mesurée dans le même extrait :

concentrations molaires : mM et (écarts types) - N = 2

Tréhalosémie :	33,8	(9,62)
Glycémie :	17,35	(10,11)
Fructosémie :	0,04	(0,05)


v
0,5
S
5
10
20
mM
v
0,40
Gl.
100
200
mM
v
0,5
S
10
20
mM
H
inhibition
0,5
log S
1
0
-1
ρ=0,986
n=0,589
Cas normal
H
0
1
log S
-1
ρ=0,993
n= 0,743

No 635

Fig. 9

3° Etude des Nymphes blanches / yeux roses (N_2)

(fig. 10)

Extraction sur 10 Nymphes : 230 µl

soit 23 µl par Nymphe - Centrifugation à 2000 g pour éliminer les éléments cellulaires et lipidiques en suspension -

Prises d'essai : 5 µl

a.) Courbe de saturation directe -

V_M = 2,86 nmoles / mn par µl

K = 4,94 mM

n = 0,951

b). Influence du glucose sur la vitesse initiale

conditions expérimentales : S = 1,8 mM

$\frac{v_0}{2}$ obtenue avec 60 mM

c). Courbe de saturation avec inhibition.

Conc. en glucose (fixe) = 60 mM

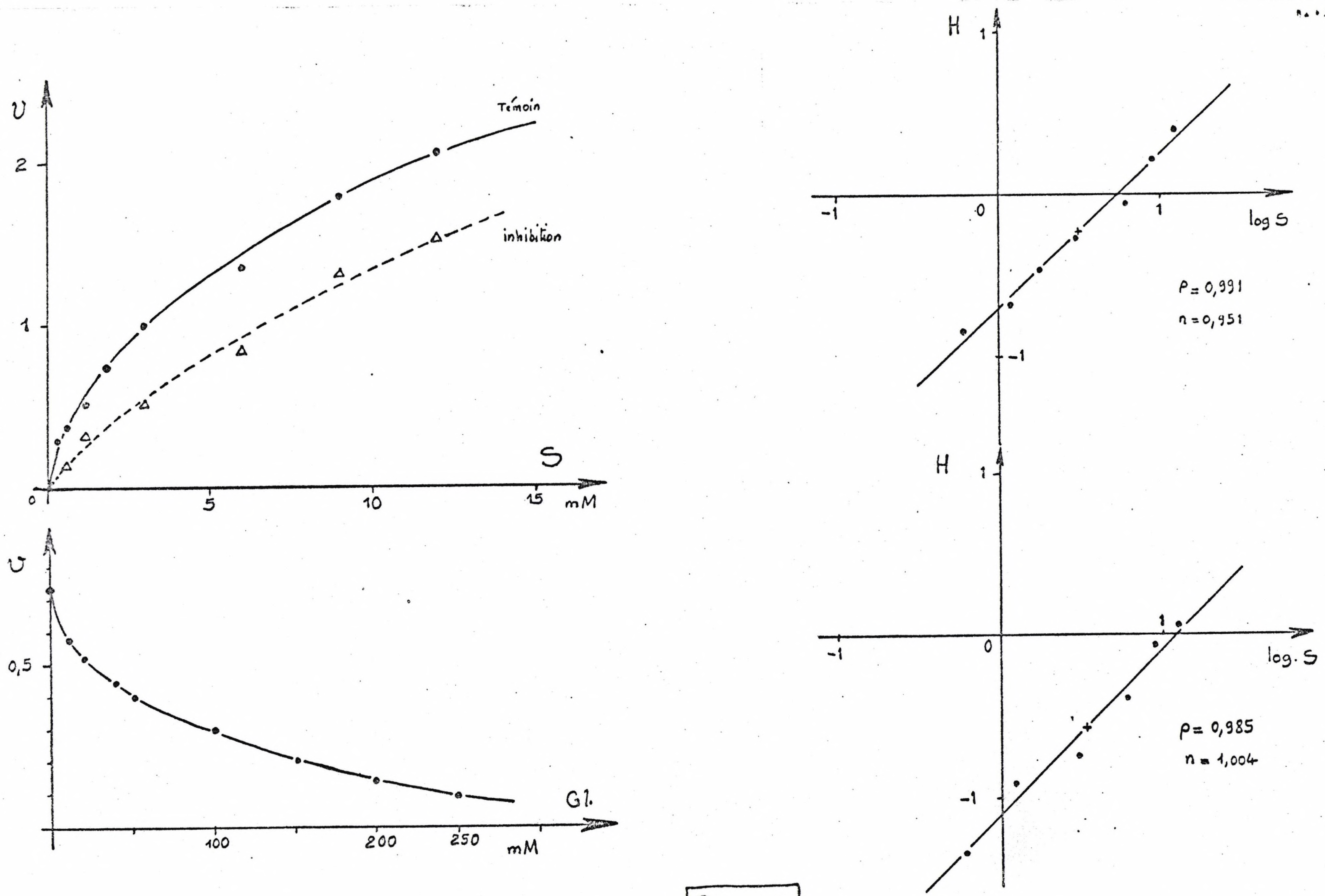
Paramètres mesurés : V_M = 3,0 nmoles / mn par µl

K = 12,96

n = 1,00

d) Glycémie dans le même extrait :

Sucres	concentr. molaire (mM)	écarts types (N=2)
Trehalose	22	0,0
Glucose	15,1	15,4
Fructose	1,07	1,3



v
2
1
Témoin
inhibition
S
0
5
10
15
mM
v
0,5
Gl.
100
200
250
mM
H
1
-1
0
1
log S
-1
ρ = 0,991
n = 0,951
H
1
-1
0
1
log. S
-1
ρ = 0,985
n = 1,004

Fig. 10

Nz
635

4° Etude des Nymphes Brunes (N5).

fig. 11

Extractions sur 20 nymphes Poids Moyen : 118 mg par animal

Volume d'hémolymphe : 7,25 µl / nymphe

Prises d'essai : 2,5 µl

a). courbe de saturation témoin.

V_M = 0,94 nmoles / mn par µl

K = 4,20 mM

n = 1,09

b). Influence du glucose sur la vitesse initiale.

Condition d'expérience : S 2,4 mM

$\frac{V_0}{2}$ obtenue avec : 70 mM

c). Courbe de saturation avec inhibition.

[Glucose] : 20 mM fixe, in vitro

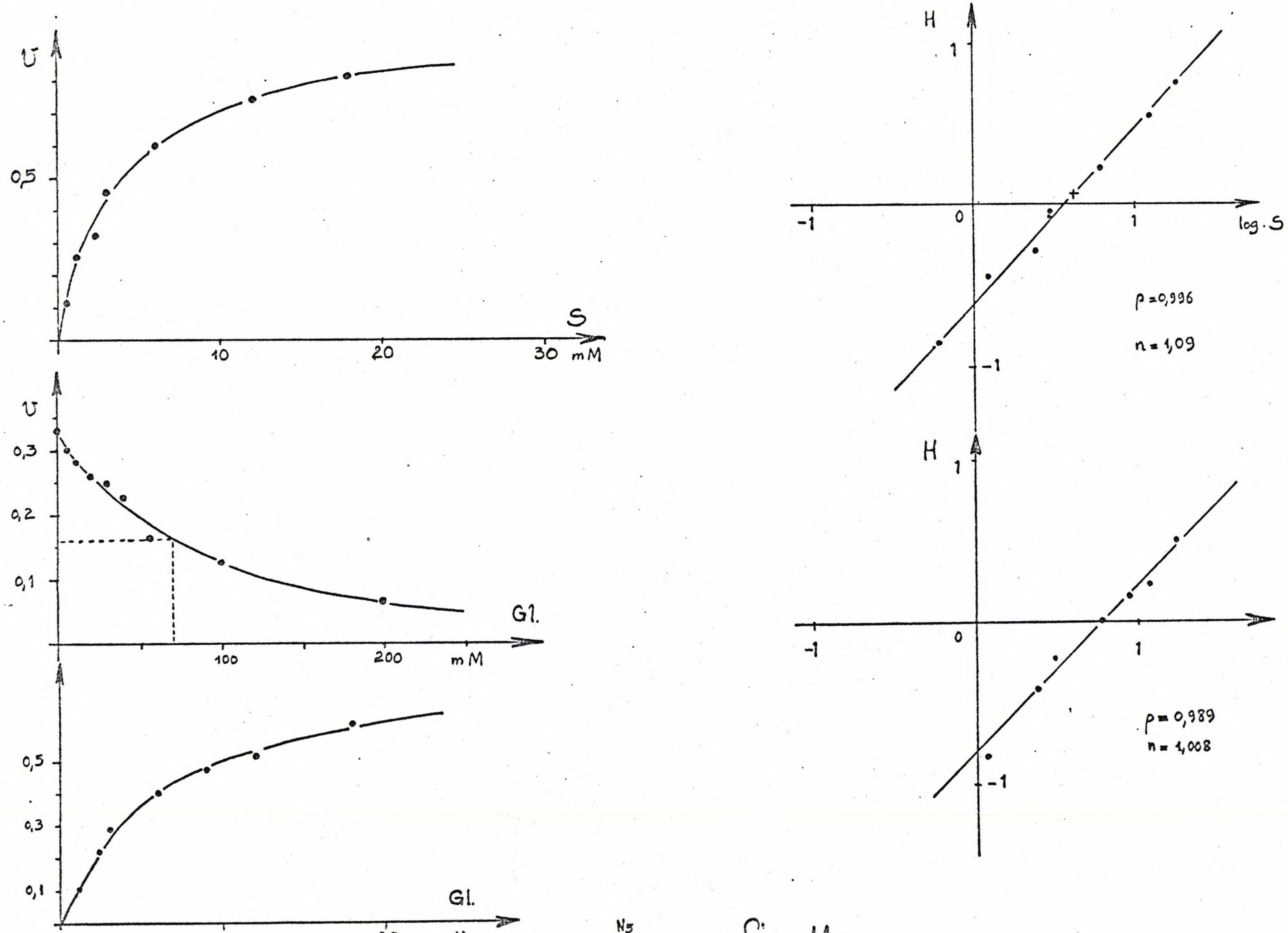
Paramètres mesurés : V_M = 0,80 nmoles / mn par µl

K = 6,28

n = 1,008

d). Glycémie mesurée dans le même extrait :

Sucres	Molarité (mM)	Ecarts types (N = 3)
Tréhalose	30,3	5,23
Glucose	5,23	2,22
Fructose	0,11	...



Ns 635

Fig. 11

Ns 635

5° Etude des Naissantes. (Fig. 12)

Extractions sur 15 Abeilles : 72,5 µl soit 4,8 µl par Abeille

Prises d'essais 2,5 µl - (D.O. 0 à 0,5)

a) - Courbe de saturation directe.

VM = 0,65 nmole/mn par µl

K = 3,11 mM

n = 1,02

b) - Influence du glucose sur la vitesse initiale -

condition d'expérience : S = 4,2 mM

$\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 50 mM

c) - Courbe de saturation avec inhibition -

Glucose : 50 mM in vitro

VM = 0,555 nmole/mn par µl

K = 10,02

n = 0,98

d) - Glycémie déterminée à la même époque :

Sucre -	Molarité (mM)	Ecarts types (N=3
Tréhalose	60,13	10,94
Glucose	8,1	1,47
Fructose	5,4	0,72

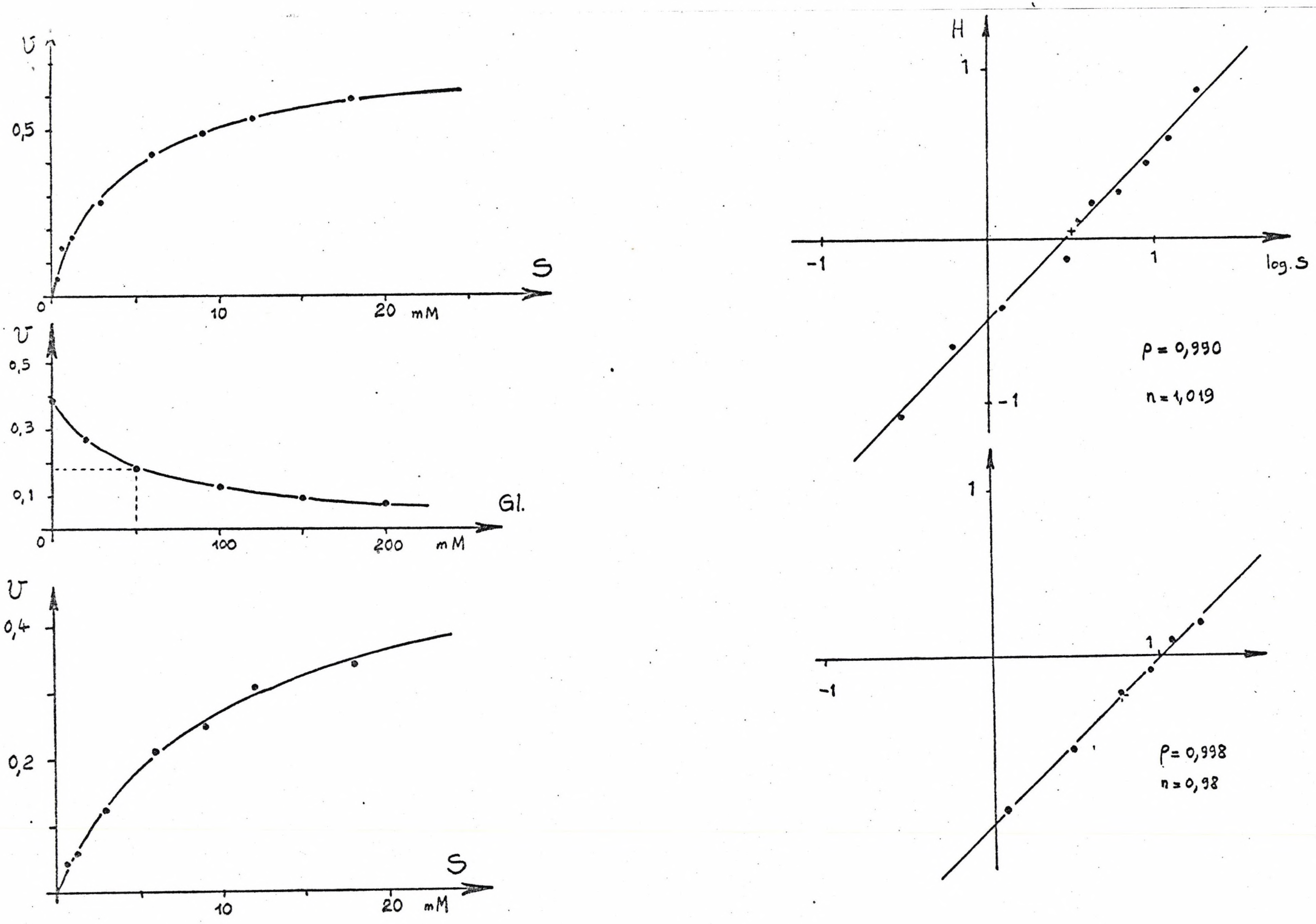


Fig. 12

A1 635

A1 635

6° Etude des butineuses.

(Fig. 13)

3 séries d'essais portant sur 55 Abeilles

Volume d'hémolymphe : 110 µl soit 2,00 µl par Abeille

prises d'essais : 2 µl

a). Courbes de saturation

V_M = 9,1 nmoles / mn par µl

K = 3,72 mM

n = 1,00

b. Influence du glucose sur la vitesse initiale

conditions moyennes : S = 2,8 mM

$\frac{v_o}{2}$ obtenue avec 90 mM glucose.

c. Courbe de saturation avec inhibition.

Concentration de glucose in vitro : 80 mM

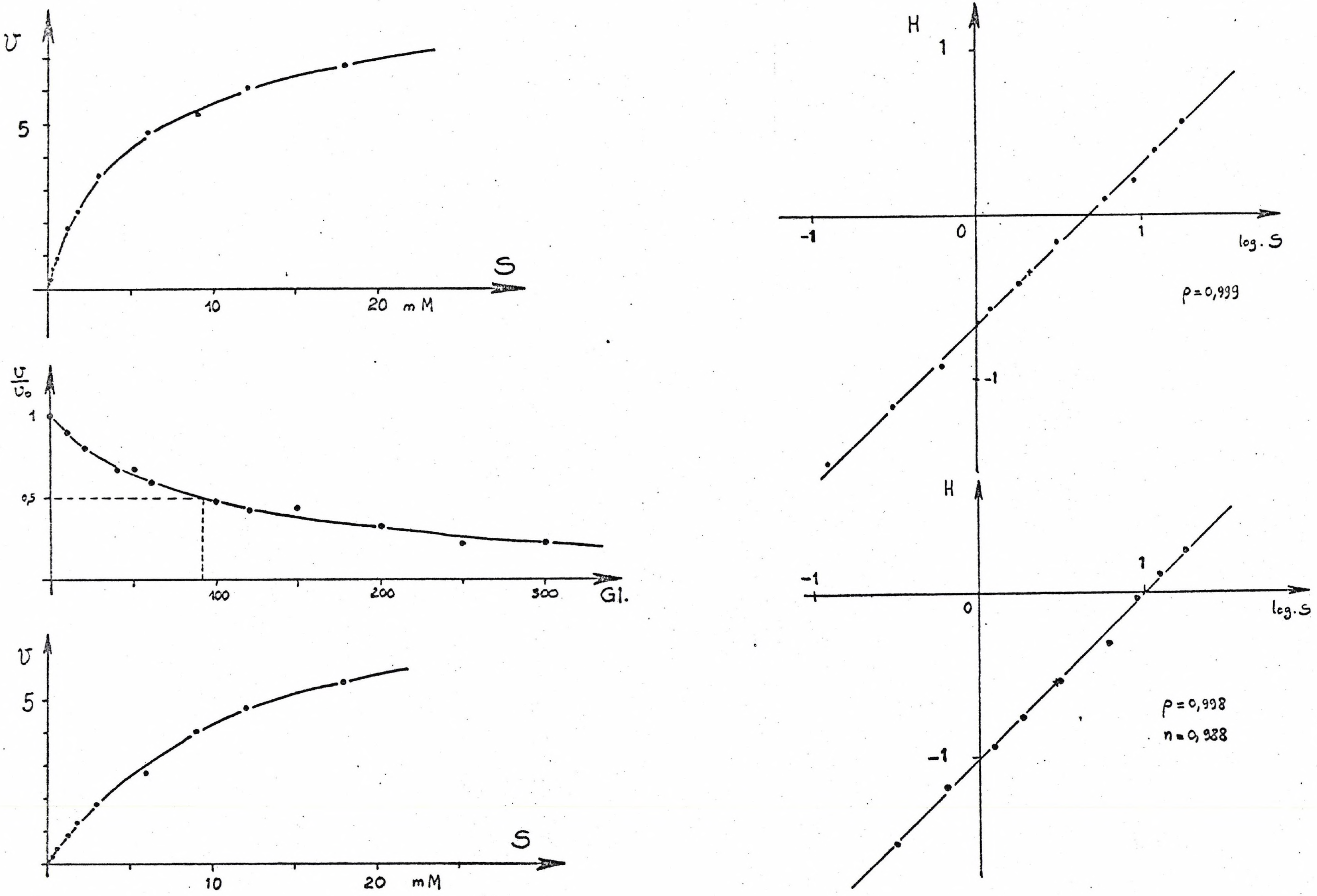
V_M = 8,57 nmoles/mn par µl

K = 10,13 mM

n = 0,988

d. Glycémie mesurée les mêmes jours :

Sucres	molarité (mM)	Ecarts-Types (N=15)
Tréhalose :	14,7	4,7
Glucose :	18,7	5,1
Fructose :	6,0	3,0



Ab 635 fig 13 Ab 635

D - PARAMÈTRES CINÉTIQUES DÉTERMINÉS SUR LA COLONIE 767 -

Les travaux réalisés sur la colonie 635 ont été repris sur la 767 déjà utilisée en 1974. Celle-ci semble avoir subi, cependant, un changement de reine entre-temps.

Les analyses de la glycémie ont été effectuées dans tous les cas à partir de prélèvements effectués dans l'extrait enzymatique lui-même, avant et pendant les essais cinétiques.

1° Larves du 5ᵉ stade -

Extractions sur 10 larves. Poids moyen : 137,1 mg par larve

Recueil : 230 µl d'hémolymphe, soit 23 µl par larve.

Prises d'essais : 5 µl - Température de réaction : 31°C ± 1°C

a). Courbe de saturation directe

VM = 0,25 nmoles/mn par µl

K = 4,12 mM (Fig. 14)

n = 0,98

b) Influence du glucose sur la vitesse initiale :

pour S = 6 mM : $\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 50 mM

c) Courbe de saturation avec inhibition :

En présence de 80 mM de Glucose in vitro :

VM = 0,20 nmoles/mn par µl

K = 7,48 mM (8,99 avec 1ᵉʳ point exclu du calcul)

n = 0,72 (0,807 " " " " " ")

d) Glycémies correspondantes : valeurs en mM

Sucres	Courbe directe	Courbe avec inhibition
Tréhalose	38	47
Glucose	2,8	7,1
Fructose	1,0	1,14

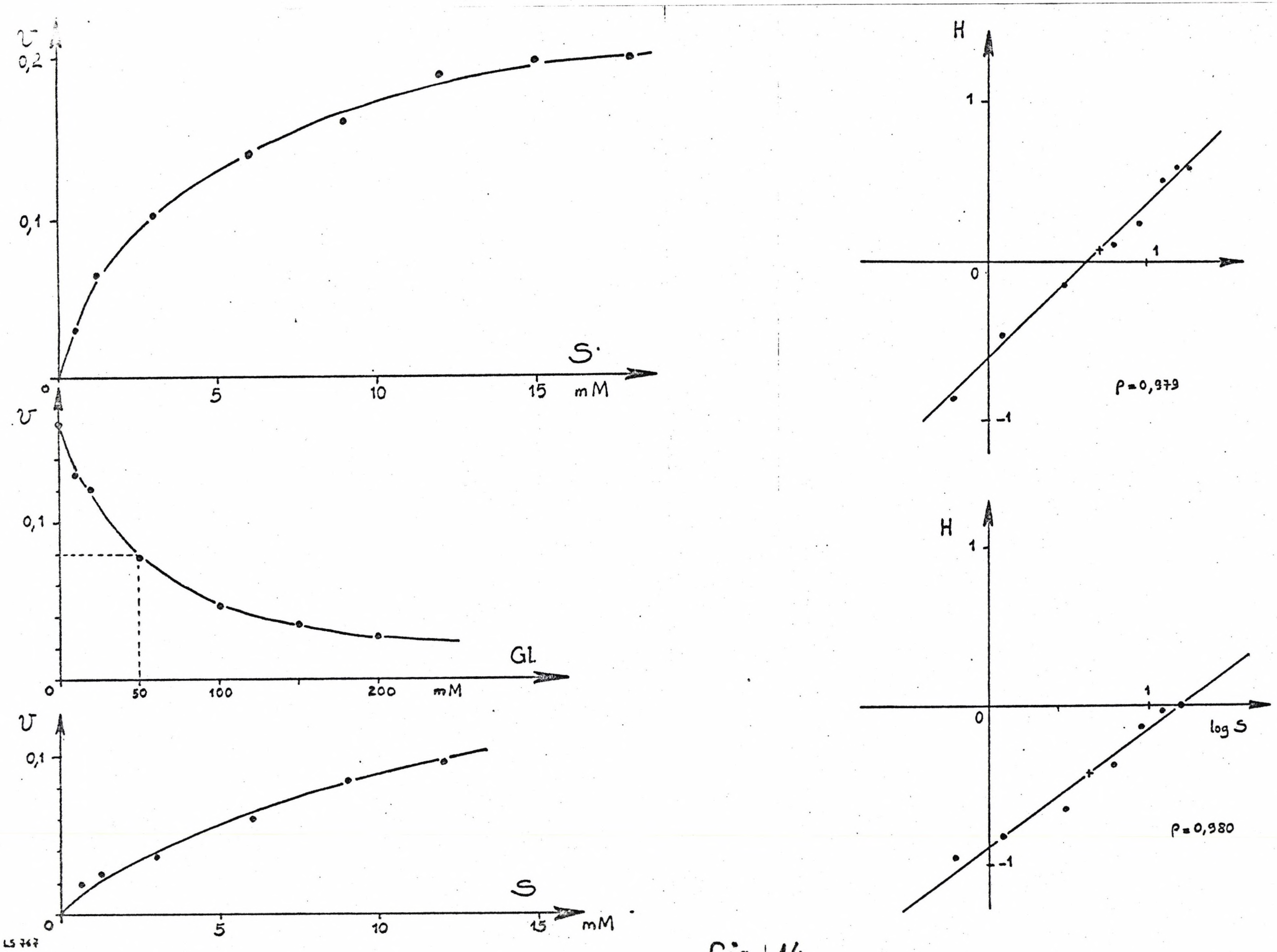

v
0,2
0,1
S
0
5
10
15
mM
v
0,1
GL
0
50
100
200
mM
v
0,1
S
0
5
10
15
mM
H
1
0
1
-1
ρ=0,979
H
1
0
1
log S
-1
ρ=0,980
LS 767

Fig. 14

2°) Etude des Nymphes blanches / Yeux blancs (No).

Prélèvements sur 10 Ny Poids moyen : 143,7 mg

Centrifugation - volume recueilli : 190 µl soit 19 µl par No

Prises d'essais : 5 µl.

a) Courbe de saturation directe. (fig. 15)

VM = 0,84 nmoles / mn par µl

K = 3,52 mM

n = 1,04

b) Influence du glucose sur la vitesse initiale :

avec S = 3 mM : $\frac{Vo}{2}$ obtenu avec 60 mM de glucose

c) Courbe de saturation avec inhibition. (100 mM de glucose in vitro)

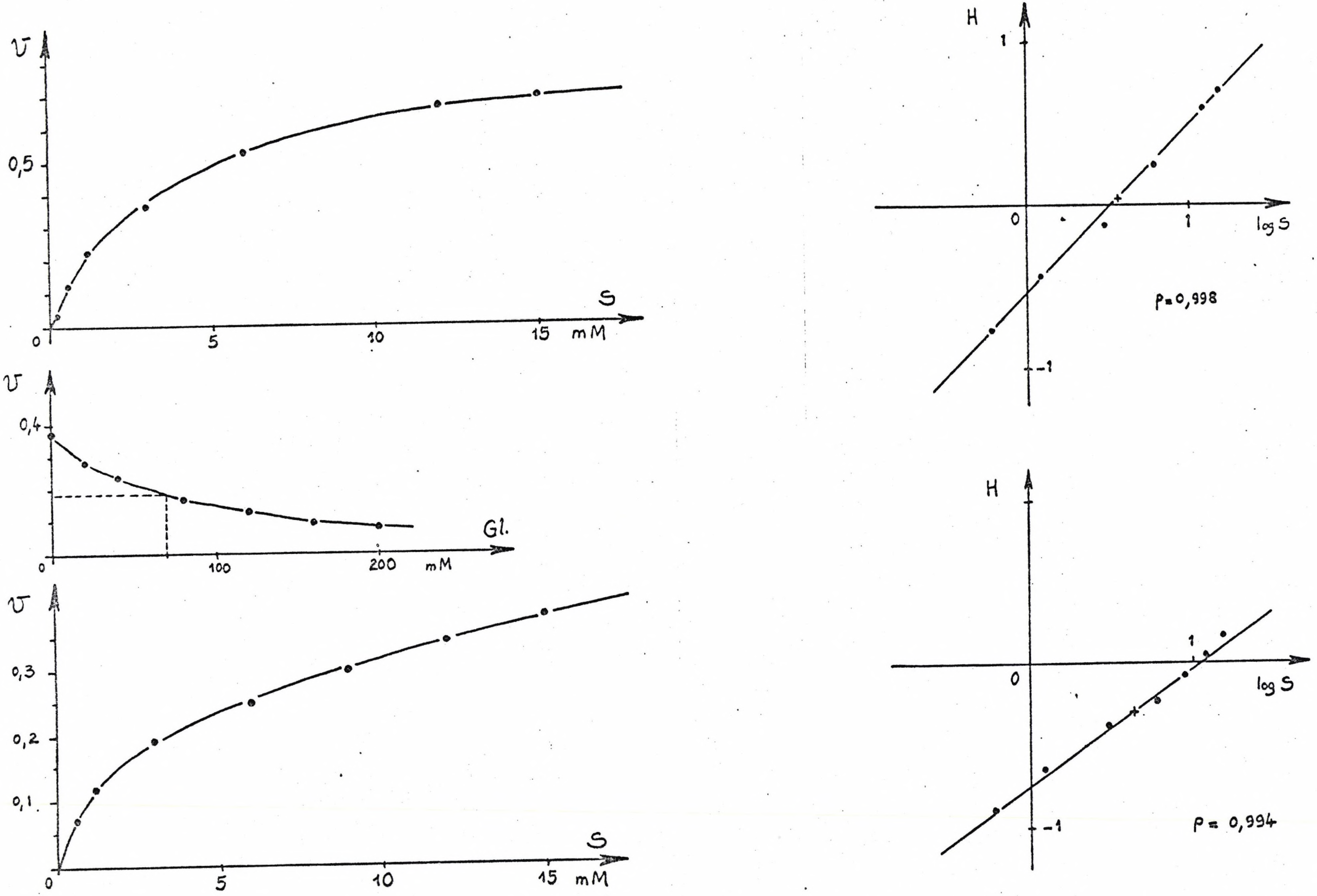
VM = 0,64 nmoles / mn par µl

K = 5,3 mM

n = 0,715

d) Glycémies correspondantes : (exprimées en mM)

Tréhalose :	21,5
Glucose :	38,0
Fructose :	0,04
Ose à faible PM (pentose) . . . . . :	1,05



v
0,5
S
0
5
10
15 mM
v
0,4
Gl.
0
100
200
mM
v
0,3
0,2
0,1
S
0
5
10
15 mM
H
1
0
1
log S
ρ=0,998
-1
H
1
0
log S
-1
ρ= 0,994

No767

fig. 15

3° Etude des Nymphes blanches / yeux rose-marron (N_2)

Extractions sur 10 Nymphes. Poids Moyen 141,67 mg

Volume recueilli après centrifugation : 113 µl soit 11,3 µl / N_2

Prises d'essais : 2,5 µl.

a). Courbe de Saturation directe : (fig. 16)

VM = 2,3 nmoles / mn par µl

K = 2,18 mM

n = 1,00

b). Influence du glucose sur la vitesse de réaction :

avec S = 1,8 mM : $\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 60 mM de Glucose in vitro.

c) Courbe de Saturation avec inhibition :

concentration en glucose : 60 mM in vitro.

VM = 1,90 nmoles / mn par µl

K = 7,9 mM

n = 0,925

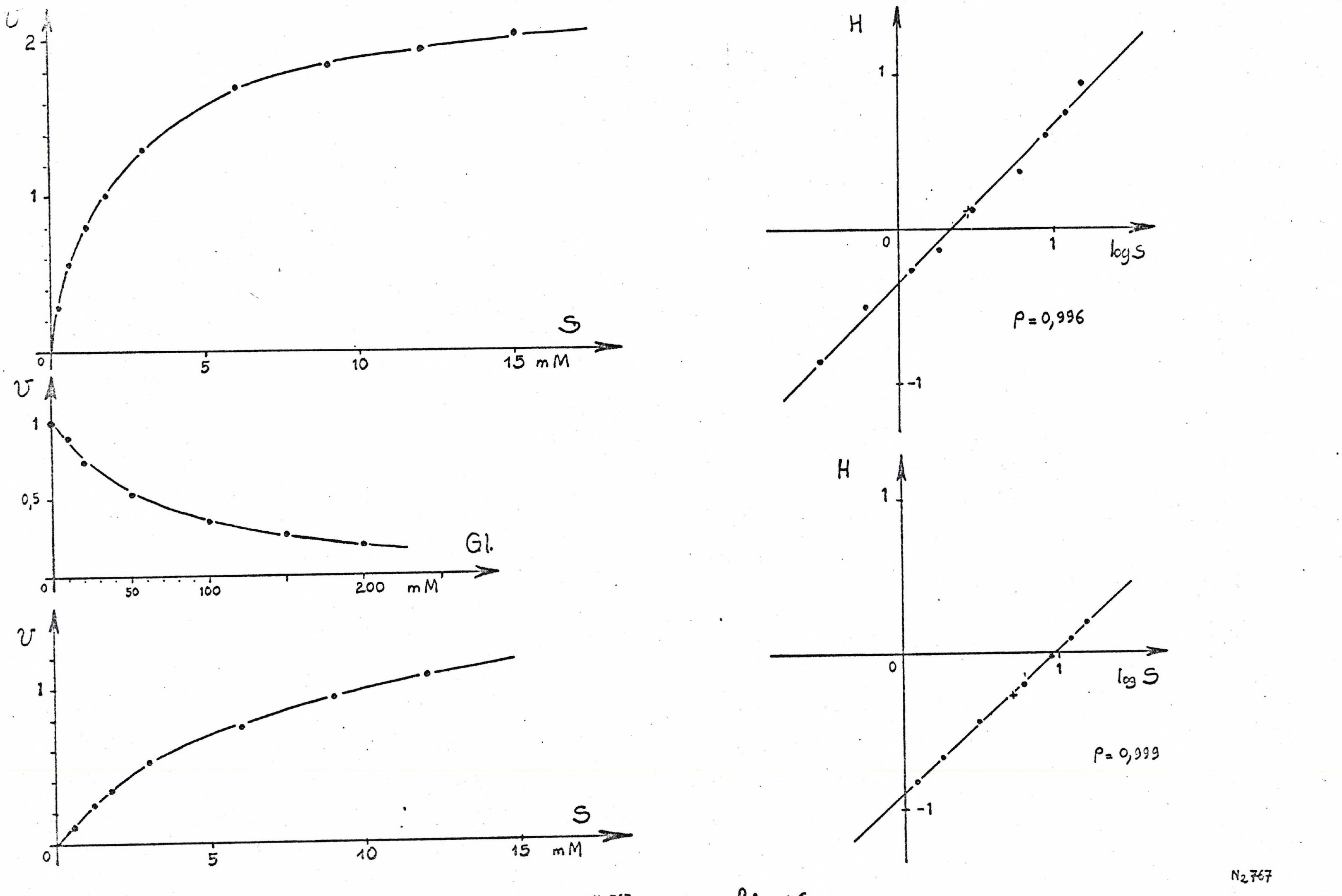
d) Glycémies correspondantes.

Tréhalose : 11,5 mM

Glucose : 6,2 mM

Fructose : 0,08 mM

Ose à faible PM (C_5 ?) : 1,13 mM



v
2
1
S
0
5
10
15 mM
v
1
0,5
Gl.
0
50
100
200 mM
v
1
S
0
5
10
15 mM
N2767
H
1
0
1
log S
ρ = 0,996
-1
H
1
0
1
log S
ρ = 0,999
-1
N2767

fig. 16

4° Etude des Nymphes / yeux violets (N3)

Extractions sur 10 Nymphes corps blanc rosé (légèrement piqueté d'orangé) provenant du même cache que les N2 précédentes.

Volume recueilli après centrifugation : 97,5 µl soit 9,75 µl par Nymphe.

Prises d'essais : 2,5 µl.

a) Courbe de saturation directe.

VM = 3,5 nmoles/mn par µl (fig. 17)

K = 2,5 mM

n = 1,04

b) Influence du glucose sur la vitesse initiale

Avec S = 1,8 mM

$\frac{V_0}{2}$ obtenu avec 60 mM de Glucose in vitro

c) Courbe de saturation avec inhibition.

Glucose ajouté : 100 mM in vitro.

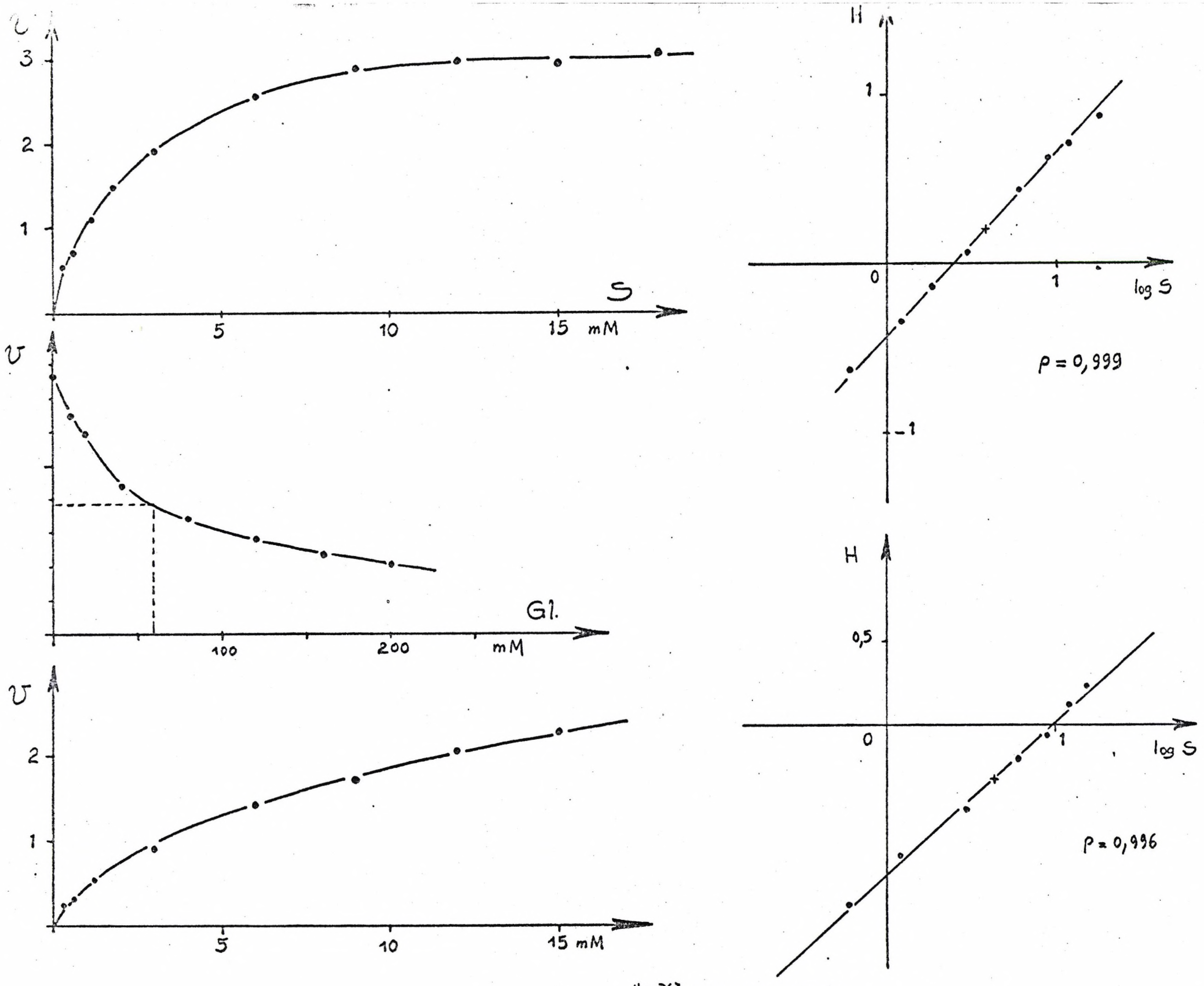
VM = 3,6 nmoles/mn par µl

K = 7,34 mM

n = 0,896

d) Glycémies correspondantes :

	Le 13/6	Le 12/6
Tréhalose	29 mM	36 mM
Glucose	103 mM	64 mM
Fructose	Trace	0,22 mM
Oligoside ..	1,1 mM	0,82 mM



N3.767

fig. 17

N3.767

5º Etude des Nymphes marron-clair (N4/N5)

Abdomen gris, thorax marron clair.
Prélèvements sur 10 Ny. recueil après centrifugation : 160 µl
soit 16 µl par individu. Prises d'essais : 2,5 µl.

a) Courbe de saturation directe. (fig. 18)

$V_M = 1,78$ n moles / mn par µl
$K = 4,01$ mM
$n = 0,818$

b) Influence du Glucose sur la vitesse initiale :

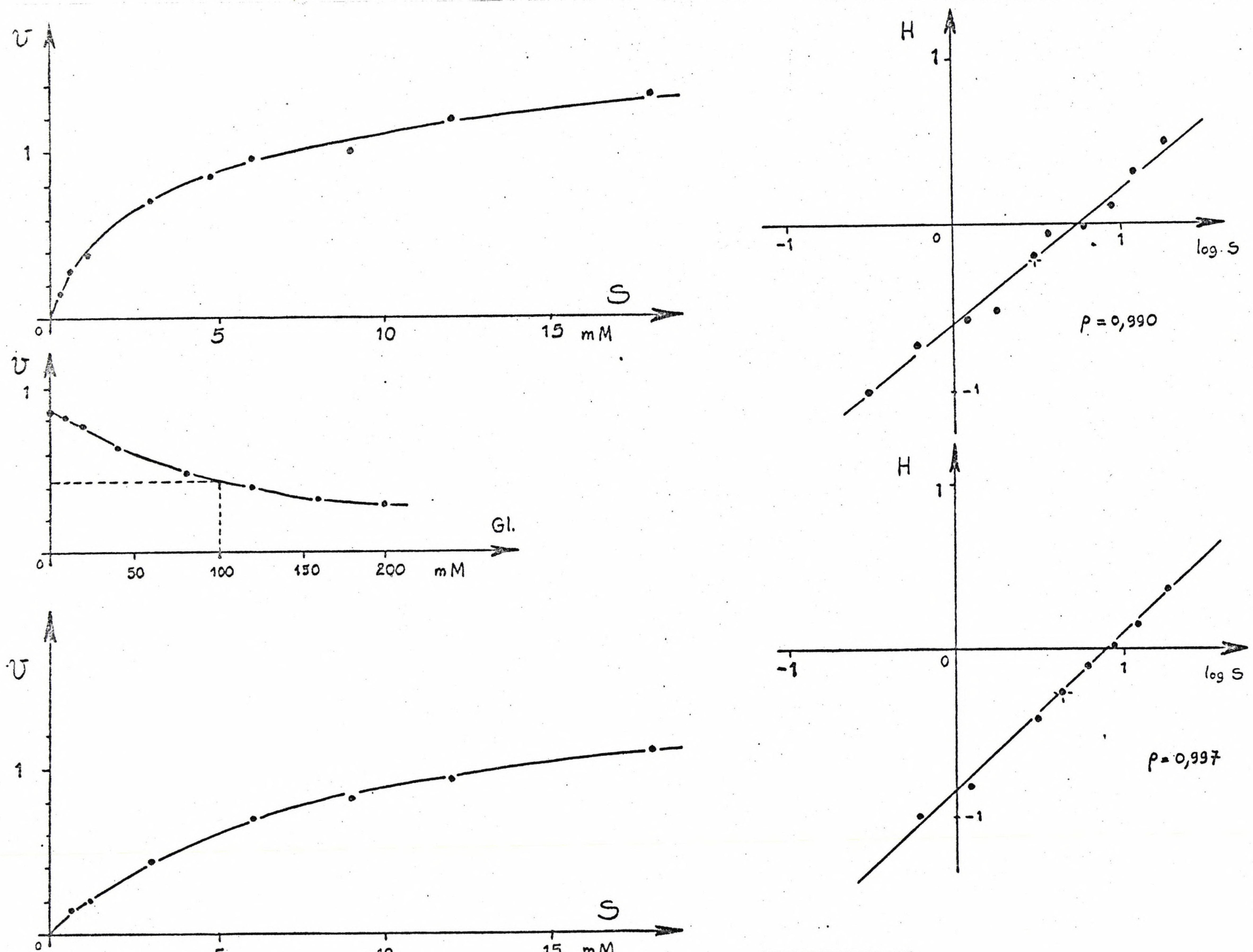
Avec $S = 4,8$ mM
$\frac{V_0}{2}$ obtenu avec 100 mM de Glucose in vitro

c) Courbe de saturation avec inhibition.

Glucose introduit in vitro : 60 mM
$V_M = 1,58$ n moles / mn par µl
$K = 6,9$ mM
$n = 0,929$

d) Glycémie correspondante.

	Moyenne (mM)	Ecart type (N=4)
Tréhalose	34,9	7,566
Glucose	47,00	19,60
Fructose	Trace.	---
Ose à faible P.M.	0,13	---



N WS 767

fig. 18.

N WS 767

6° Etude des Nymphes brunes (N5)

Stade succédant aux N4 (encore claires) caractérisé par le thorax marron (chataigne) - Extrait sur 15 N5 de poids moyen : 128 mg par individu -

Paramètres naturels (courbe de saturation directe) : (fig. 19)

V_M = 1,35 nmoles /mn par µl

K = 3,87 mM

n = 0,961 (droite de HILL : ρ = 0,997)

Glycémie correspondante :

Tréhalose : 41 mM

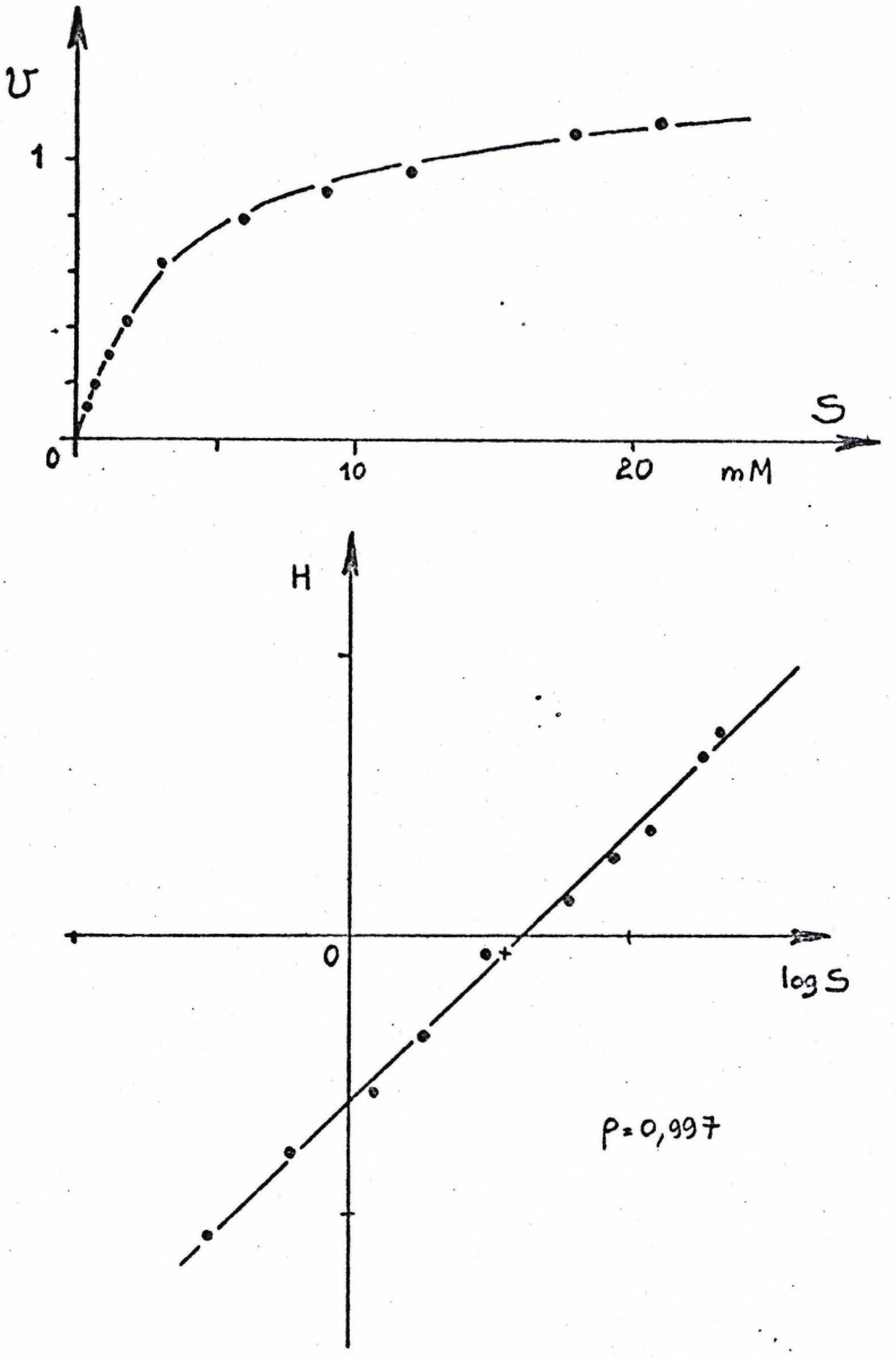
Glucose : 22 mM

7° Nymphes N6 : limite de la métamorphose (marron foncé)

3 lots de 5 individus ont été analysés successivement avec des prises d'essais respectives de 2,5 - 5 et 10 µl destinées à contrôler l'influence de la dilution -

• Courbes de saturation directes : (fig. 20

Paramètres	dilution de l'extrait enzymatique 100 fois	50 fois	25 fois
V_M nmoles/mn par µl ...	1,16	1,14	1,15
K mM	5,0	4,35	4,76
n	1,03	1,05	1,01
Glycémies correspondantes :			
Tréhalose mM	70,4	53,6	53,6
Glucose mM	29,8	19,1	8,9



NS - 767

fig. 19

- **Influence de la concentration en glucose sur la vitesse initiale de réaction.**

Concentration en substrat : 2,4 mM fixe

$\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 90 mM de glucose

Chez les N6, l'ordre de la réaction est remonté vers 1 et dans le cas d'individus en train de développer leurs ailes (pré-Naissantes), on a observé un cas très précis où les paramètres : VM = 1,10 nmoles/mn par µl

K = 3,55

n = 1,21

ont servi à l'étude théorique de l'équation générale $v = \frac{VM.S^n}{K+S^n}$ (pages 5 à 10 du mémoire).

NB: Les abeilles de ce lot présentaient une Tréhalosémie normale (48 mM) mais une faible glycémie (7,4 mM)

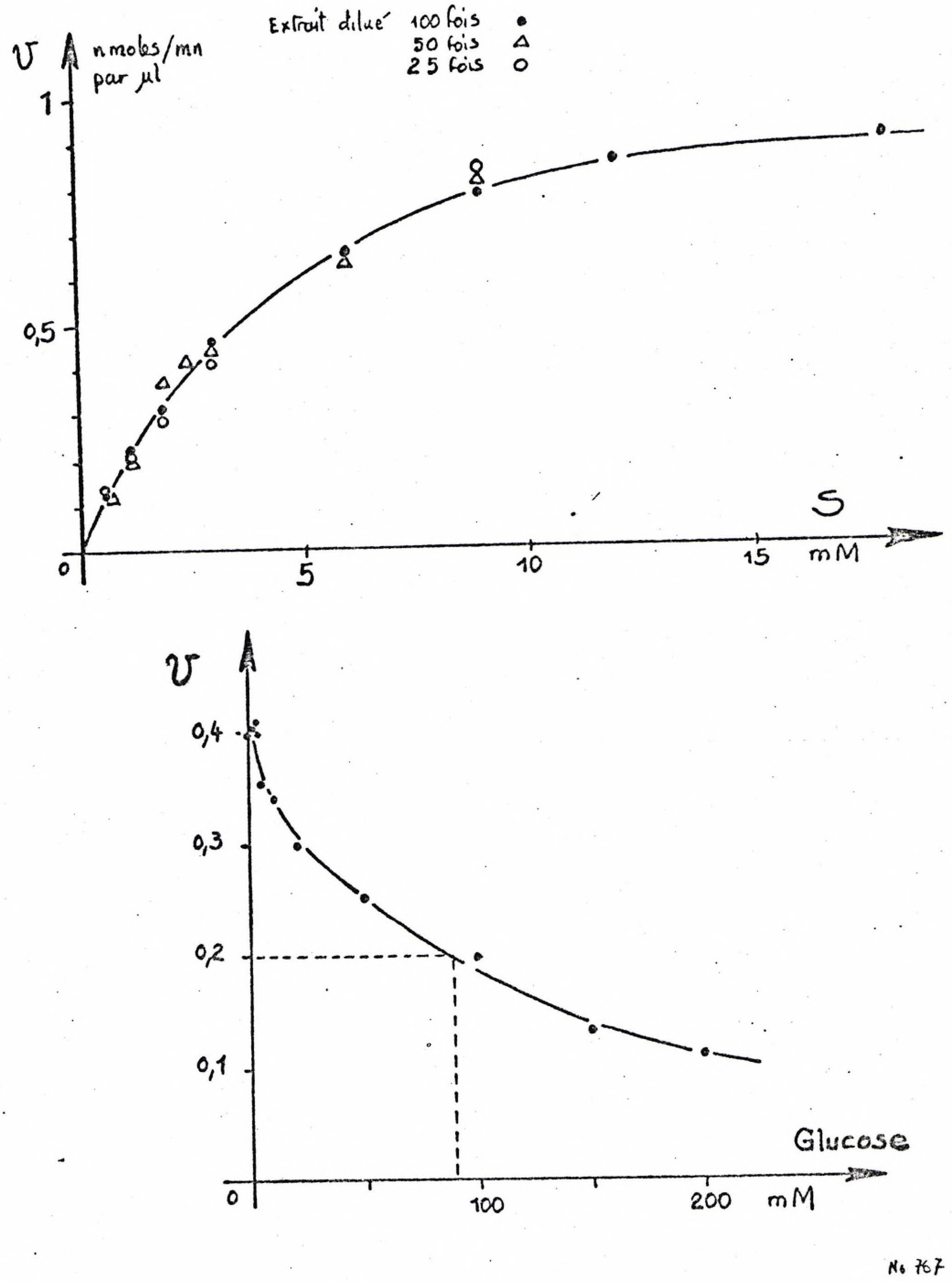

Extrait dilué 100 fois ●
50 fois △
25 fois ○
v
nmoles/mn
par µl
1
0,5
0
5
10
15
S
mM
v
0,4
0,3
0,2
0,1
0
100
200
Glucose
mM
No 767

fig. 20

8º Abeilles naissantes

Extractions sur 10 Abeilles en alvéoles encore operculés.

Poids moyen : 123,5 mg par individu

Volume d'hémolymphe recueilli : 195 µl soit 19,5 µl par Abeille.

Prises d'essais : 5 µl. (D.O. de 0 à 1).

a. Courbe de saturation directe.

VM = 0,77 nmoles/mn par µl

K = 2,85 mM

n = 0,937

b. Influence de la concentration en glucose.

avec S = 3 mM, $\frac{Vo}{2}$ est obtenue pour 90 mM de glucose ajouté in vitro.

c. Courbe de saturation avec inhibition

Glucose introduit in vitro : 80 mM (fixe)

VM = 0,704 nmoles/mn par µl

K = 5,14 mM

n = 0,871

(fig. 21)

d. Glycémie correspondante :

Tréhalose : 42 mM

Glucose : 6,8 mM

Fructose : 0,4 mM

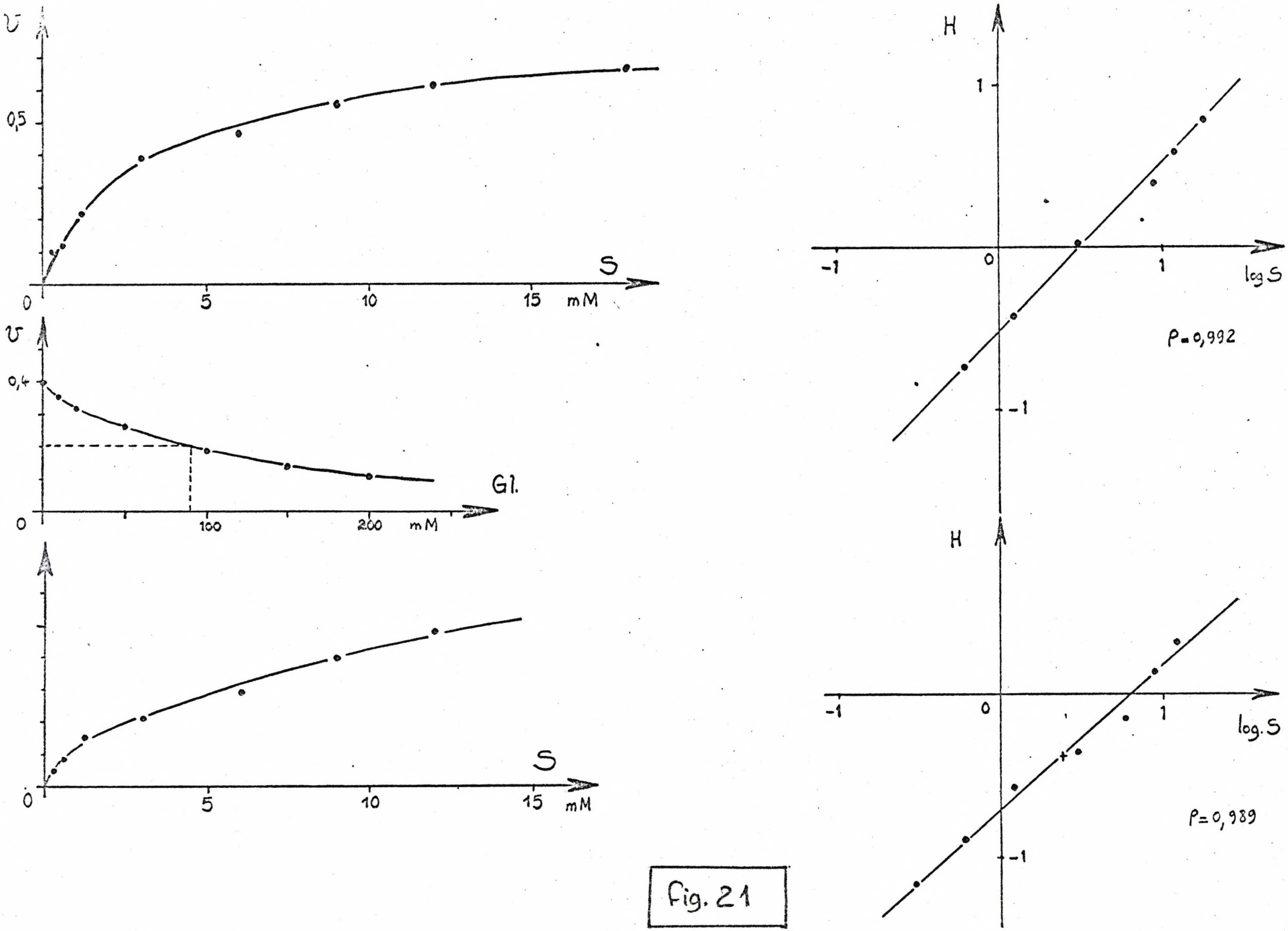


Fig. 21

A. 767

A. 767

9° Abeilles butineuses.

1ère série : Juin 1975.

Extractions sur 30 Abeilles - Volume recueilli : 66 µl
soit : 2,2 µl par Abeille

a. courbe de saturation directe.

Prises d'essais de 2 µl.

VM = 10,2 nmoles/mn par µl

K = 3,81 mM

n = 1,01

b. Influence du glucose sur la vitesse de réaction :

S = 2,4 mM fixe.

$\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 140 mM de glucose in vitro.

c. Courbe de saturation avec inhibition.

Concentration de Glucose in vitro : 60 mM ajoutées

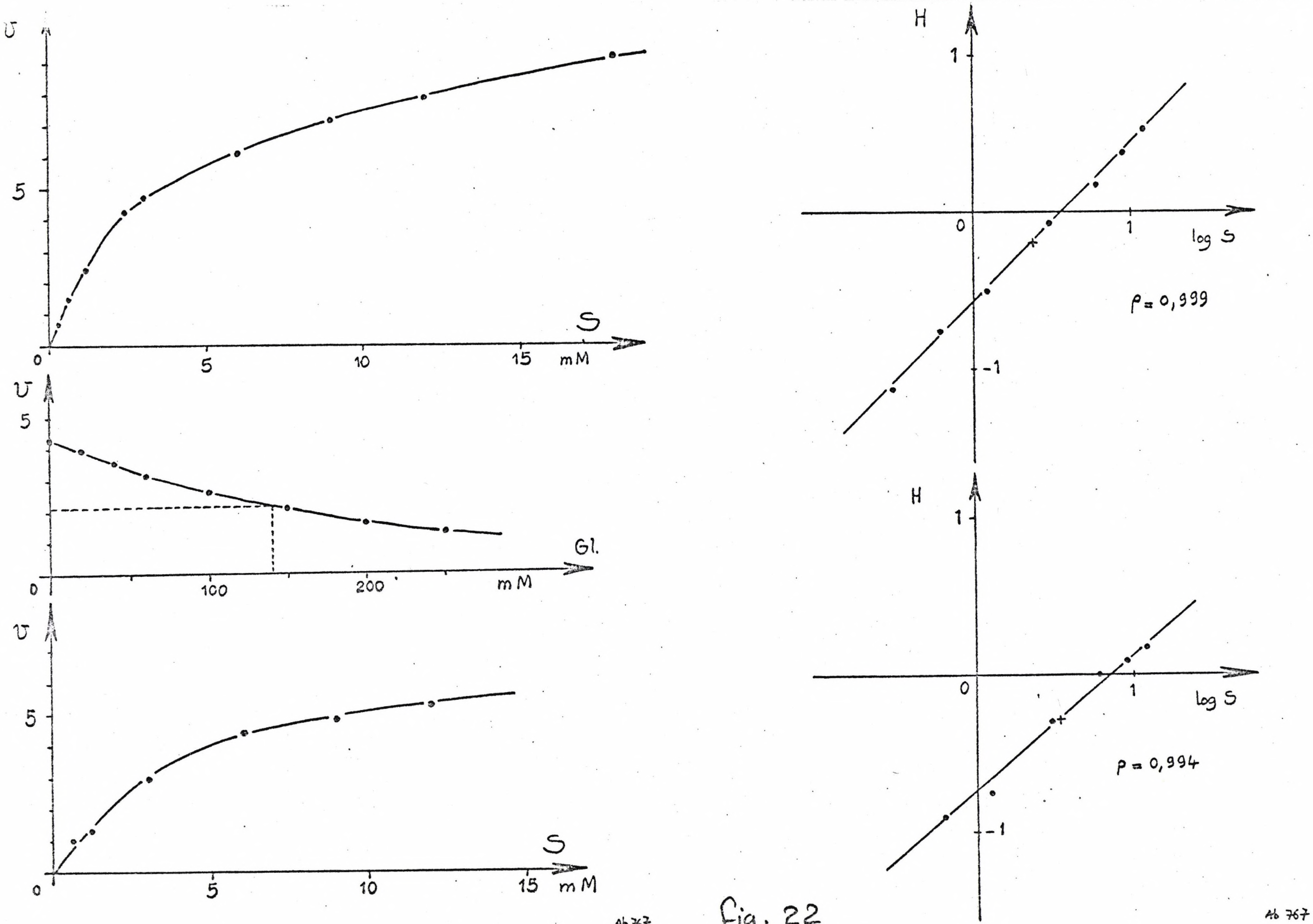
VM = 8,77 nmoles/mn par µl

K = 5,52 mM

n = 0,878 (fig. 22)

d. Glycémie correspondante.

Trehalose :	12,5 mM	(± 3,0)
Glucose :	19,3 mM	(± 0,6)
Fructose :	1,85 mM	(± 0,70)



v
5
S
0
5
10
15
mM
v
5
Gl.
0
100
200
mM
v
5
S
0
5
10
15
mM
H
1
0
1
log S
-1
ρ = 0,999
H
1
0
1
log S
-1
ρ = 0,994
Ab 767
Ab 767

fig. 22

2e et 3e Série : Etude des paramètres cinétiques dans l'hémolymphe pré-diluée.

Les prises d'essais d'hémolymphe "pure" sont amenées à un volume final de 250µl au moment de la réaction. Les études réalisées chez les nymphes N6 ont montré la stabilité des paramètres mesurés avec des prises d'essais variables. Le but de cet essai est d'effectuer la comparaison avec de l'hémolymphe pré-diluée (c'est à dire avant la réaction) et des prises d'essais inchangées au moment de la réaction. (1µl)

• Courbe de saturation avec hémolymphe non diluée.

Extraction sur 9 Abeilles.
Volume recueilli : 35µl soit 3,9µl par individu.
VM = 7,25 nmoles/mn par µl
K = 3,86 mM
n = 1,01

• Courbe de saturation avec hémolymphe diluée 2 fois.

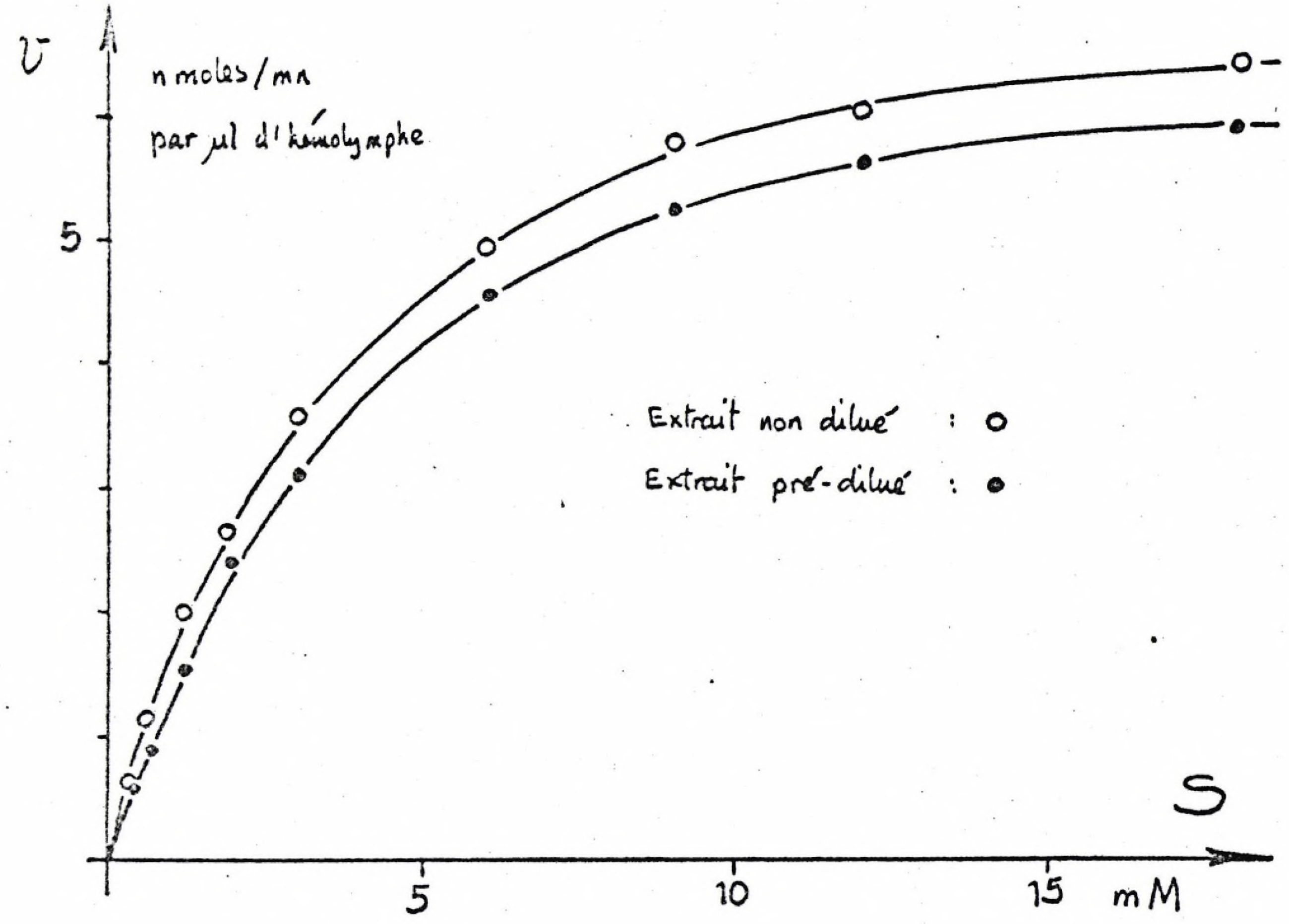
VM = 7,86 n moles/mn/µl
K = 3,35 mM
n = 0,972

(Fig. 23)

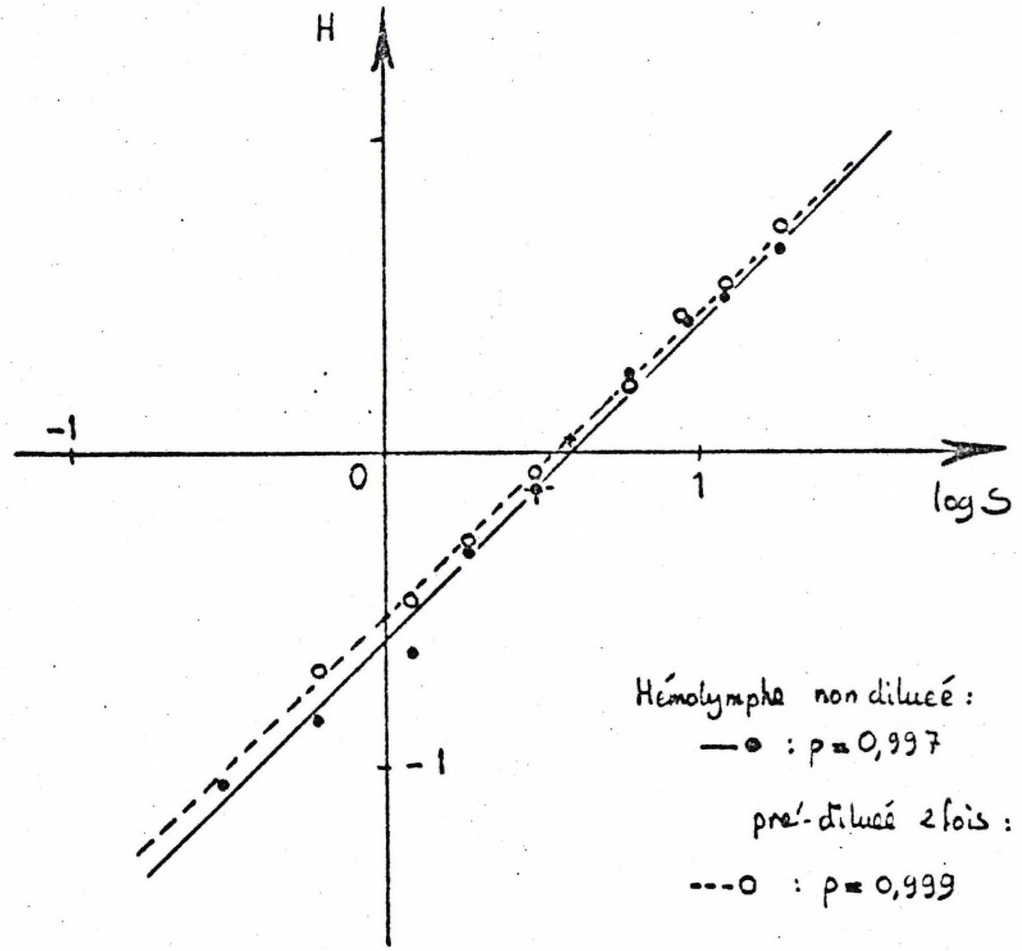
• Glycémie correspondante :

Tréhalose	:	36 mM
Saccharose	:	0,55 mM
Glucose	:	16,2 mM
Fructose	:	17,7 mM

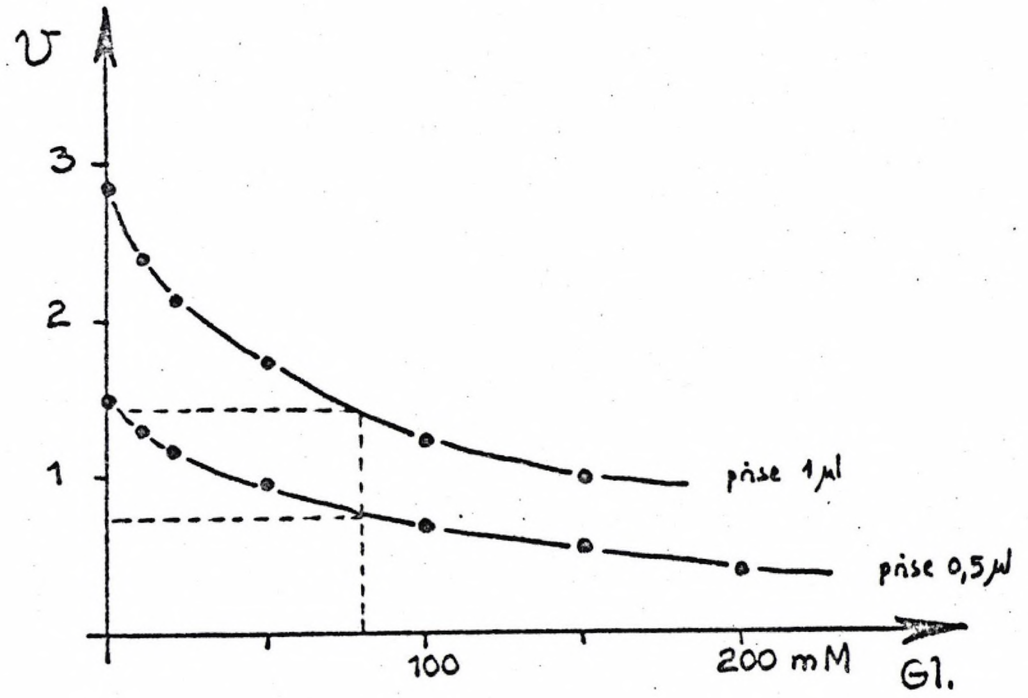
La dilution préalable de l'extrait enzymatique n'entraîne qu'un assez faible écart dans la détermination des paramètres cinétiques (7,7% sur VM) ; la proportionnalité entre vitesse de réaction et concentration en enzyme est une condition (réalisée) de la validité des équations théoriques.



v
n moles/mn
par µl d'hémolymphe
5
Extrait non dilué : o
Extrait pré-dilué : •
S
5
10
15
mM



H
-1
0
1
log S
-1
Hémolymphe non diluée :
—• : p = 0,997
pré-diluée 2 fois :
---o : p = 0,999



v
3
2
1
prise 1 µl
prise 0,5 µl
100
200 mM
Gl.

fig. 23

Ab 767

- **Influence du Glucose sur la vitesse de réaction dans le cas d'hémolymphe dilué 250 fois ou 500 fois.**

La même concentration molaire de glucose est introduite dans le milieu réactionnel en présence de prises d'essais de 0,5 µl et 1 µl respectivement dans le but de vérifier si la dilution de l'enzyme n'a pas d'influence sur le taux d'inhibition - (volume réactionnel : 250 µl).

- Extractions sur 8 Abeilles. Volume recueilli : 18,5 µl soit 2,31 µl par individu
- concentration en substrat (fixe) : 2,4 mM.

[Glucose] mM	Vitesse de réaction dans les 2 cas : prise d'essai 0,5 µl (dilution 500 fois) nmoles/mn par ½ µl	prise d'essai 1 µl (dilution 250 fois) nmoles/mn par µl
0	1,48	2,96
10	1,3	2,4
20	1,1	2,1
50	0,95	1,7
100	0,7	1,2
150	0,5	0,99
200	0,38	...

Les représentations graphiques aboutissent dans les 2 cas à $\frac{V_0}{2}$ pour 80 mM de glucose (c'est à dire que le rapport $\frac{V}{V_0}$ ne dépend pas de la dilution de l'enzyme).

4ᵉ Série : Courbes de Saturation en présence de glucose introduit dans l'hémolymphe ou dans le milieu réactionnel -

Dans un cas, le glucose est préalablement ajouté à l'hémolymphe qui se trouve alors diluée 2 fois et dans l'autre cas, le glucose est ajouté au milieu réactionnel - Les prises d'essais sont de 1 µl -

a) - Courbe de Saturation directe.

VM = 12,4 nmoles / mn par µl
K = 3,58 mM
n = 1,03

b) - Courbe de saturation avec inhibition in vitro dans le milieu de réaction -

Glucose introduit : 150 mM (concentration finale)
Extractions sur 9 Abeilles - Recueil 39 µl d'hémolymphe -

VM = 11,3 nmoles/mn/µl
K = 8,67 mM
n = 1,01

c) - Courbe de saturation sur hémolymphe préalablement dilué 2 fois en présence de 125 mM de Glucose -

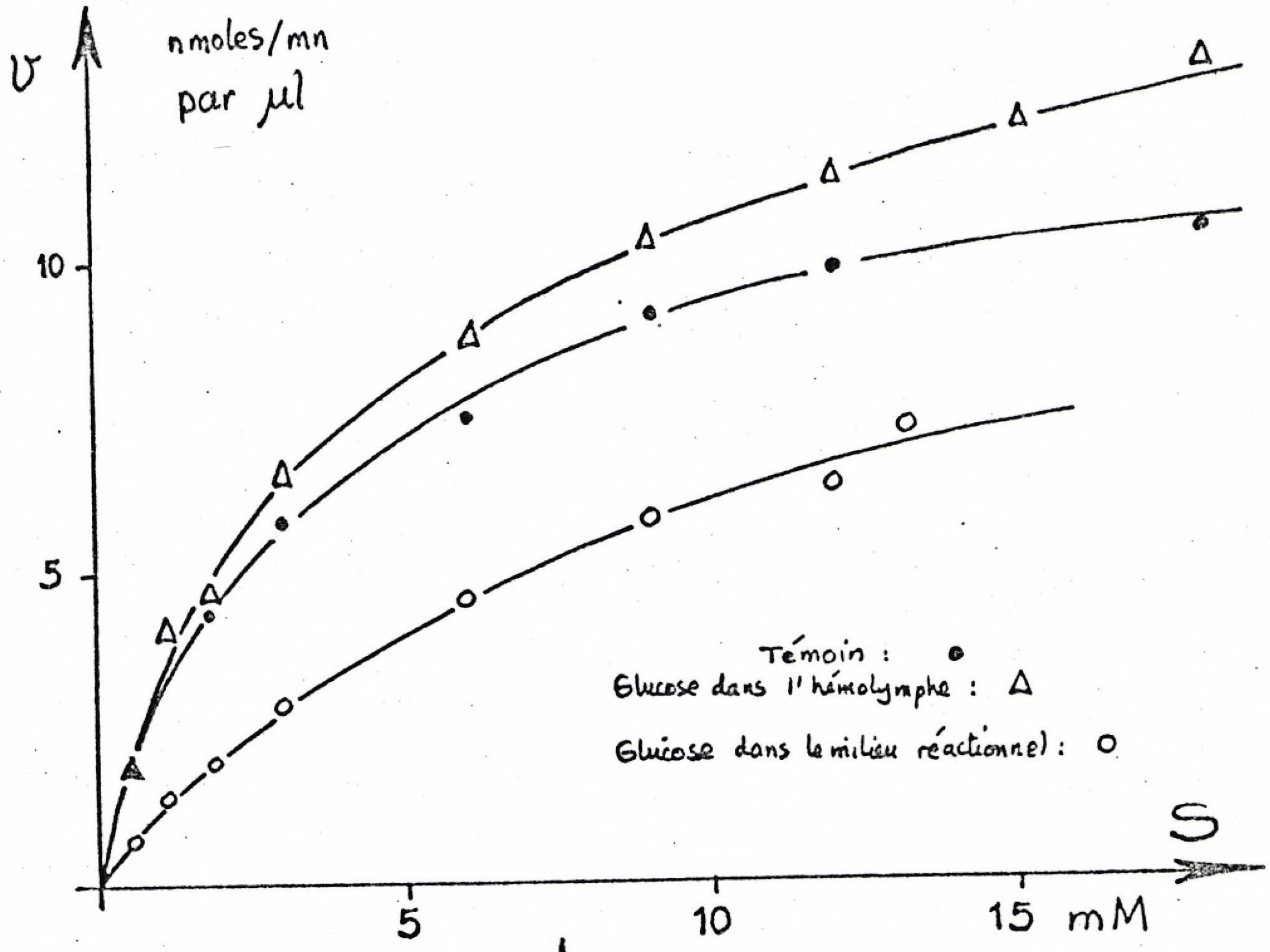
prise d'essai 1 µl - dilution finale du glucose : 0,5 mM

VM = 14,9 nmoles / mn par µl
K = 3,8 mM
n = 1,05

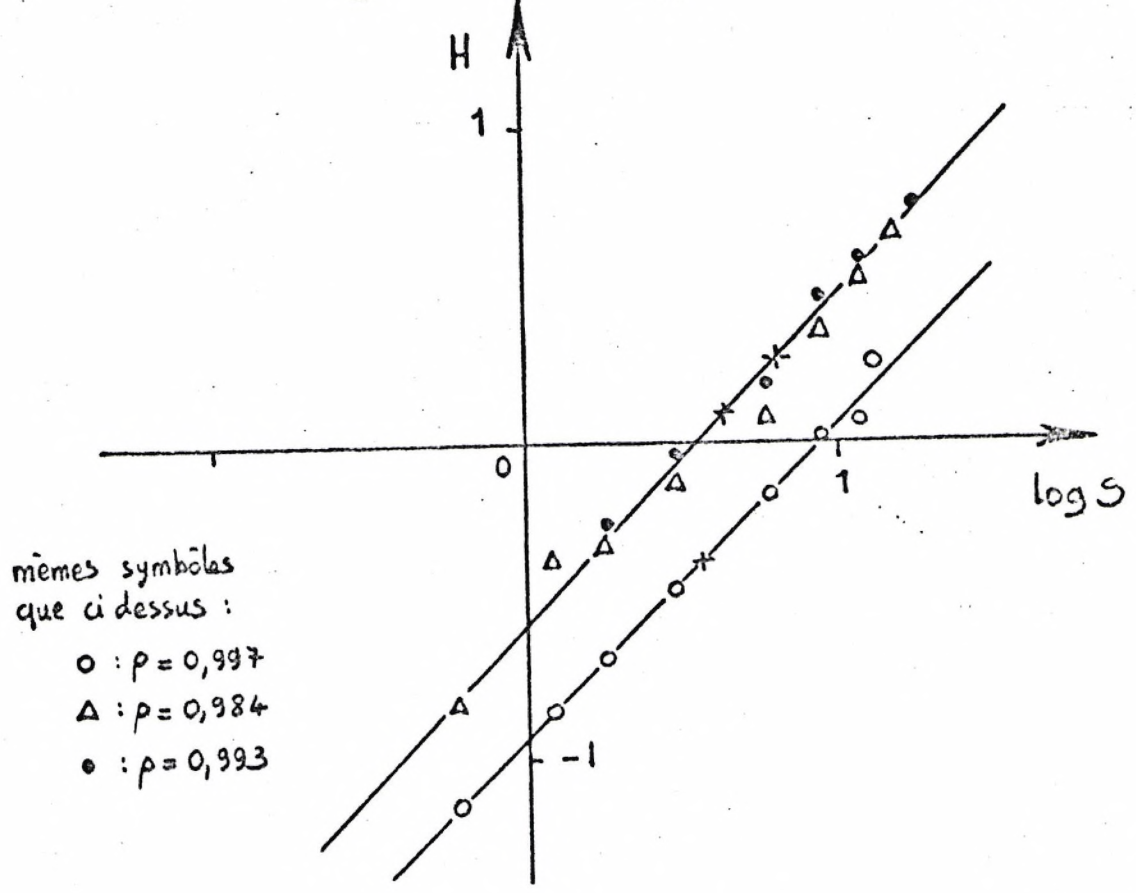
(fig. 24)

d) Glycémies correspondantes :

Sucres		cas b) . et cas c)
Tréhalose	:	55,2 mM
Glucose	:	32,8 mM
Saccharose	:	0
Fructose	:	41,2 mM



v
nmoles/mn
par µl
10
5
Témoin : •
Glucose dans l'hémolymphe : Δ
Glucose dans le milieu réactionnel : o
S
5
10
15 mM



H
1
0
1
log S
-1
mêmes symboles que ci dessus :
o : ρ = 0,997
Δ : ρ = 0,984
• : ρ = 0,993

Ab 767

fig. 24

En définitive, la proportionnalité entre vitesse et concentration en enzyme, déjà vérifiée en 1974, se confirme dans l'étude des paramètres, qu'il s'agisse du calcul de V_M, K et n, ou de l'influence des concentrations en glucose sur la vitesse initiale.

Dans la majorité des cas, l'inhibition par le glucose se traduit par une modification assez faible, ou nulle, de la vitesse maximum, et par une augmentation de la valeur de K (soit une diminution de l'affinité (enzyme)-(substrat)).

Chez les larves et les nymphes, l'inhibition par le glucose s'accompagne généralement d'un changement de l'ordre de la réaction, qui ~~devient~~ inférieur à l'unité : dans ce cas, l'affinité entre enzyme et substrat est protégée et la constante K augmente peu.*

Le mécanisme d'inhibition affectant plus la constante d'affinité que la vitesse maximum, son étude mathématique sera maintenant abordée dans l'hypothèse d'une inhibition de type K

---

* Plusieurs cas particuliers ont été observés avec un ordre de réaction supérieur à 1 : chez des larves entre le 4e et le 5e stade avec inhibition in vitro, et chez des nymphes en cours de métamorphose, après les observations similaires effectuées chez les butineuses en 1974.

E - ANALYSE DU MECANISME D'INHIBITION DES α-GLUCOSIDASES PAR LE GLUCOSE

1° Analyse théorique -

Les changements d'ordre de la réaction entraînent une modification du changement d'affinité enzyme-substrat : nous allons donc nous placer dans les cas où $n = 1$ (ou s'en rapproche à moins de 10 % près)

- L'équation de la réaction s'écrit en l'absence d'inhibiteur :

(1) $$v_o = \frac{V_M \cdot S}{K_o + S}$$ K_o = constante d'affinité du substrat pur

- et en présence d'inhibiteur [I] :

(2) $$v_i = \frac{V_M \cdot S}{K_o\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + S}$$ K_i = constante d'affinité de l'inhibiteur pur.

- L'inhibiteur étant ici toujours présent (glycémie non nulle) en même temps que le substrat, l'étude de la courbe de saturation permet de déterminer une constante d'affinité intermédiaire entre K_o et K_i, que nous appellerons :

Constante d'affinité résultante : K_R

...

Or, la cinétique résultante a pour équation :

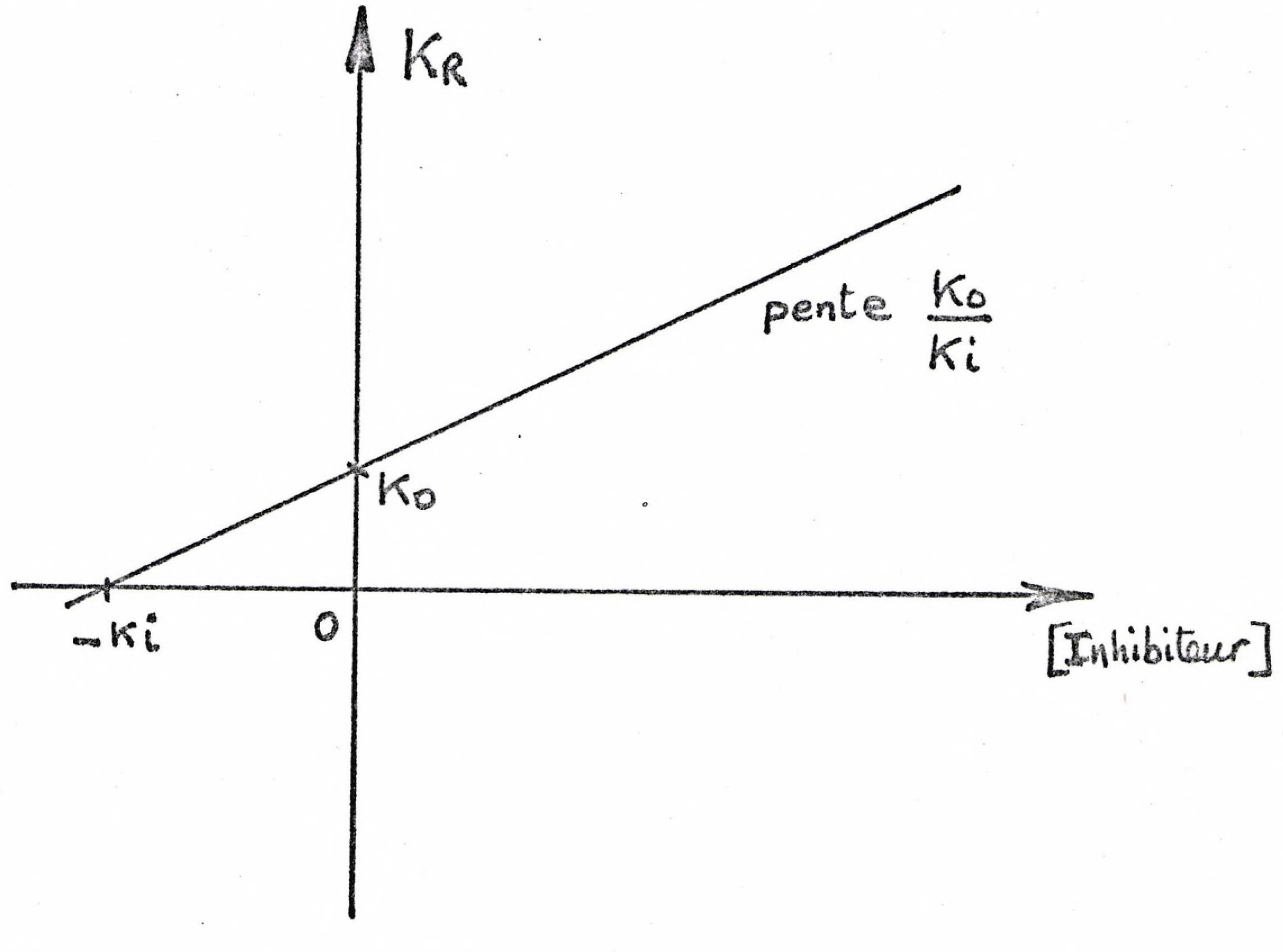
(3) $$V_R = \frac{V_M \cdot S}{K_R + S}$$ dans laquelle la constante

K_R dépend de la concentration en inhibiteur, comme le montre l'équation (2) qui permet d'écrire :

$K_R = K_o \left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)$ ce qui devient (4) :

(4) $$K_R = \frac{K_o}{Ki}[I] + K_o$$

La constante résultante est fonction linéaire de la concentration en inhibiteur. Sa représentation graphique doit se traduire par une droite coupant l'axe des ordonnées au point $y = K_o$ et l'axe des abscisses au point $x = -Ki$:



Il convient donc de vérifier si au cours de nos analyses, la constante K mesurée (en fait : K_R) est proportionnelle à la concentration en glucose de l'hémolymphe (déjà présent et introduit).

2° Etude des résultats de 1974.

Les couples de points (K / [Glucose]) obtenus au cours de diverses analyses effectuées en 1974 ont été soumis à l'étude des corrélations et régressions linéaires. Sur les figures, les symbôles suivants ont été employés :

Stades	Cas naturel	inhibition in vitro
Larves	○	●
Nymphes	□	■
Naissantes	◇	◆
Butineuses	△	▲

L'analyse statistique a effectivement permis de dégager une relation linéaire, mais deux courbes différentes ont dû être distinguées :

1ère droite : Larves, nymphes et naissantes :

$$K_R = 0,16\ [Gl.] + 2,14$$

2e droite : Butineuses seulement :

$$K_R = 0,07\ [Gl.] + 2,40$$

La constante du substrat est pratiquement la même (5% d'écart) tandis que la constante d'inhibition, voisine de 13 mM dans le 1er cas atteint 36 mM chez les adultes butineuses. (fig. 25)

...

Ab 767-74

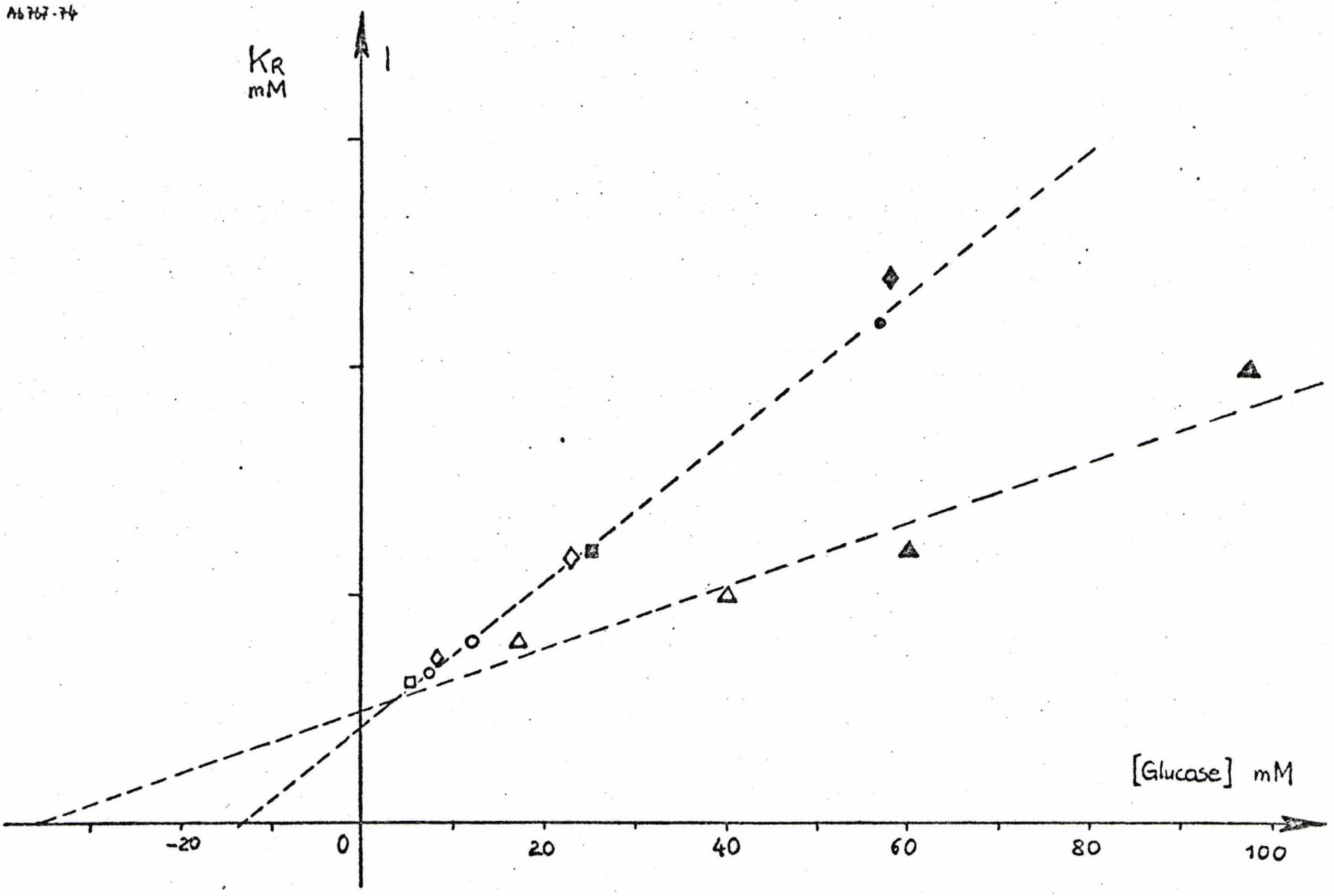


fig. 25

3° Etude des résultats de 1975

Le nombre de déterminations effectuées à partir de lots homogènes d'Abeilles a permis de calculer la régression de K_R sur G dans 3 cas :
- mesures en présence de la glycémie naturelle.
- mesures avec glucose ajouté in vitro.
- Ensemble des mesures.

Au cours des analyses de 1975, les résultats ont montré que les naissantes se rattachaient aux butineuses plutôt qu'au couvain : c'est la seule différence notable avec les expériences antérieures. (Comme il s'agit d'un stade transitoire, des naissantes encore operculées peuvent se rapprocher soit des nymphes, soit des Abeilles adultes, sans qu'il soit possible de le distinguer au moment des prélèvements.

Les équations obtenues sont indiquées ci dessous :

G_o = glycémie naturelle $\quad$ G_t = Glucose ajouté + Glucose initial.

(Fig. 26)

a) Larves et Nymphes :

(1) $K_R = 0,066\ G_o + 2,99$ $\quad$ ($N = 11$; $\rho = 0,709$)

(2) $K_R = 0,148\ G_t + 2,16$ $\quad$ ($N = 6$; $\rho = 0,930$)

(3) $K_R = 0,136\ G + 2,07$ $\quad$ ($N = 17$; $\rho = 0,930$)

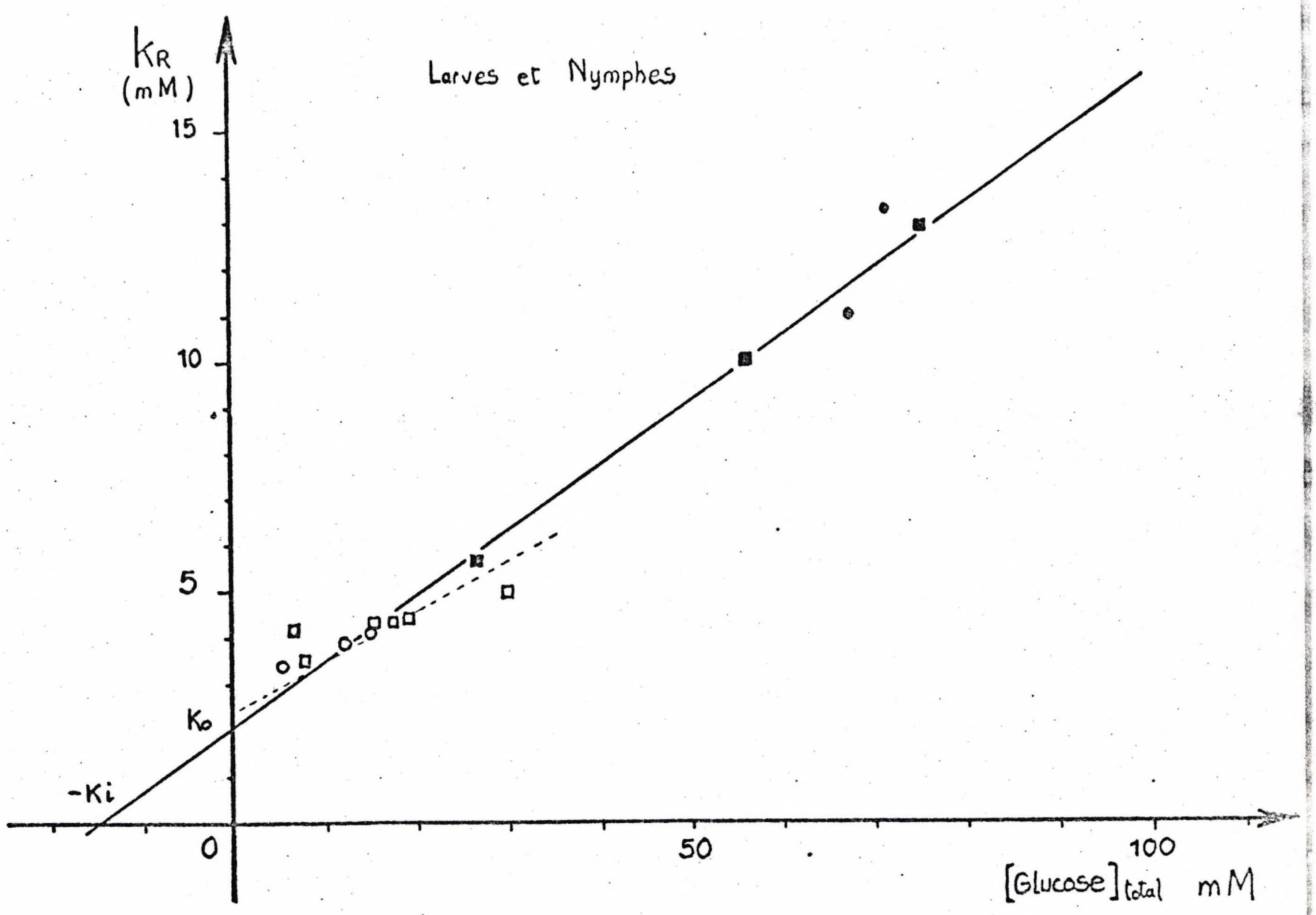
b) Abeilles naissantes et butineuses :

(1)bis $K_R = 0,027\ G_o + 2,92$ $\quad$ ($N = 13$; $\rho = 0,905$)

(2)bis $K_R = 0,038\ G_t + 3,3$ $\quad$ ($N = 5$; $\rho = 0,865$)

(3)bis $K_R = 0,046\ G + 2,6$ $\quad$ ($N = 20$; $\rho = 0,944$) [a]

(a) y compris 2 points supplémentaires acquis au cours d'autres expériences.


KR
(mM)
Larves et Nymphes
15
10
5
Ko
-Ki
0
50
100
[Glucose]total mM

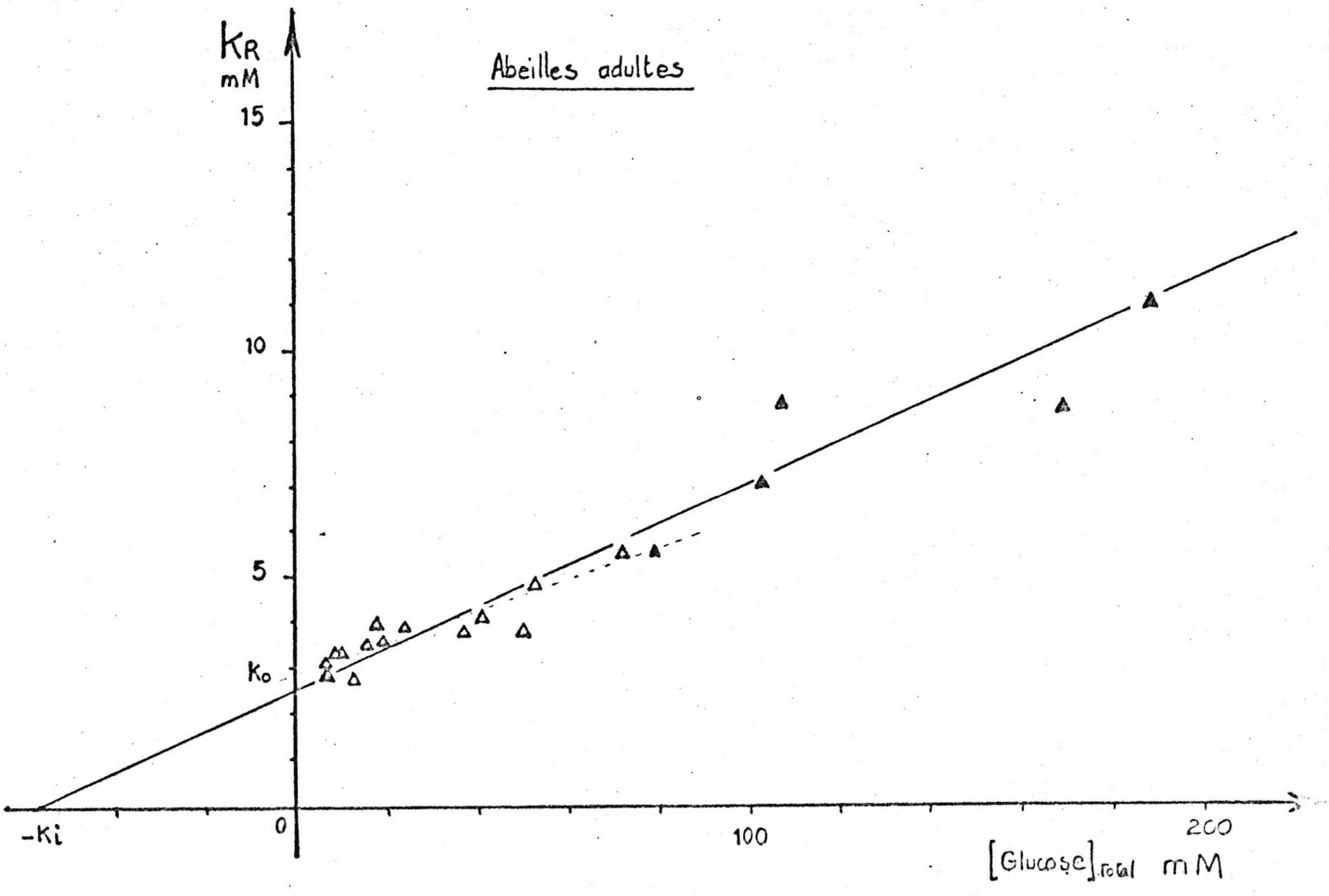

KR
mM
Abeilles adultes
15
10
5
Ko
-Ki
0
100
200
[Glucose]total mM

fig. 26

Les calculs effectués dans les cas d'inhibition en ne tenant compte que de la concentration du glucose introduit in vitro (Gi) ont donné les résultats suivants :

Larves et nymphes :

(4) $K_R = 0{,}159\ Gi + 2{,}79$ $(N = 6 ;\ \rho = 0{,}920)$

Abeilles :

(4)bis $K_R = 0{,}007\ Gi + 7{,}72$ $(N = 5 ;\ \rho = 0{,}14)$

Dans le dernier cas, l'extrême faiblesse de la corrélation ne justifie pas le calcul d'une équation ; ceci montre un aspect très important des enseignements à tirer de l'expérience :

Chez les Abeilles adultes, les paramètres cinétiques ne peuvent satisfaire la théorie que si l'on tient compte de la glycémie initiale (naturelle) : nous ~~nous~~ trouvons en présence d'un phénomène assimilable à une induction durable (au moins pour quelques heures) des propriétés cinétiques.

L'équation théorique $K_R = f(G)$ permet le calcul des constantes d'affinité entre : { enzyme et substrat pur : K_0
enzyme et inhibiteur pur : K_i

Les valeurs moyennes ont été calculées à partir des équations (1) et (1) bis, (2) et (2) bis, (3) et (3) bis et (4).

- Calcul de K_o : (mM)

• Larves et nymphes : $N = 4$ $\overline{K_o} = 2,50$ $s = 0,456$

• Abeilles : $N = 3$ $\overline{K_o} = 2,94$ $s = 0,350$

(différence non significatives : $t = 1,44$ $t/5\% = 2,57$) ($\nu = 5$) -

- Calcul de K_i (mM) :

• Larves et nymphes : $N = 4$ $\overline{K_i} = 23,09$ $s = 14,67$

$N = 3$ $\overline{K_i} = 15,79$ $s = 1,556$

(avec G_o, K_i s'écarte des autres mesures avec une valeur de 45,0 mM)

• Abeilles : $N = 3$ $\overline{K_i} = 83,84$ $s = 25,95$

(différences significatives) $t = 3,38$ $t/5\% = 2,776$ - ($\nu = 4$).

Les α-glucosidases d'Abeilles adultes diffèrent de celles des larves et nymphes au niveau de leur constante d'affinité pour le glucose, mais pas par leur constante d'affinité pour le substrat (Il est de fait que les adultes sont susceptibles de posséder, selon les circonstances, une très forte glycémie : voir chapitre suivant).

- Calculs à partir des essais 1974 :

Larves et Nymphes : $K_o = 2,14$ $K_i = 13,37$ mM

Adultes : $K_o = 2,40$ et $K_i = 34,28$ mM

Les résultats des 2 années concordent très bien - Seule, la valeur K_i chez les adultes était un peu plus faible en 1974.

Résultats groupés :

Larves et Nymphes :	$K_o = 2{,}43$	$s = 0{,}427$	$(N = 5)$
	$K_i = 15{,}18$	$s = 1{,}753$	$(N = 4)$
Abeilles adultes :	$K_o = 2{,}80$	$s = 0{,}393$	$(N = 4)$
	$K_i = 71{,}45$	$s = 32{,}600$	$(N = 4)$

Cette étude se poursuit avec la recherche des modifications des paramètres cinétiques en fonction de différentes concentrations en glucose ajoutées in vitro, l'ensemble devant être réalisé à partir d'un même prélèvement initial d'hémolymphe -

4° Conclusions.

Les α-glucosidases d'Abeilles sont assujetties à un mécanisme de rétro-inhibition par le glucose, principalement libéré à partir du tréhalose comme substrat naturel.

Le mécanisme d'inhibition paraît être du type K, mais il se traduit assez souvent par un abaissement de l'ordre de la réaction, ce qui tend à montrer que l'enzyme possède dès le départ une structure oligomérique. Cette structure peut également donner lieu à une coopérativité positive dont certains cas précis ont été observés : il existe donc des facteurs pouvant induire chez l'Abeille des modifications du type de cinétique :

L'un est partiellement connu (inhibition par le glucose chez les nymphes principalement). L'autre (ou les autres) restent à déterminer.

L'Abeille va peut-être fournir un exemple concret montrant la compatibilité, pour un même système enzymatique, entre les cinétiques "Michaeliennes", et celles à coopérativité positive (allostérie...) et à coopérativité négative (fip-flop).

Le passage de l'une à l'autre serait déterminé par l'action de certains effecteurs dont la fixation sur l'édifice moléculaire orienterait simplement l'enzyme vers l'une ou l'autre des cinétiques possibles par blocage stérique des autres formes (ou freinage électif d'un type de transition)

La part du déterminisme génétique pourrait se traduire par une plus grande facilité, pour un génotype donné, à permettre le transfert de l'ordre de la réaction vers les valeurs élevées (ou faibles) de l'ordre de la réaction.

Cette théorie unitaire, encore à l'état d'ébauche, présente l'avantage de concilier celles déjà émises précédemment :
Michaelis : $n = 1$; Monod, Wymann et Changeux : $n > 1$; Lazdunski : $n < 1$ ...

(Parmi les exemples cités à l'appui, on peut citer les transitions allostériques et michaeliennes de la phosphatase alcaline de l'orge : témoins et mutants radio-induits). (BOUNIAS, 1972)

On remarquera, enfin, que l'affinité entre enzyme et inhibiteur, plus faible chez les adultes, coïncide avec l'augmentation des concentrations molaires de glucose à ajouter pour obtenir $\frac{V_0}{2}$ (100 mM contre 60 mM chez les nymphes).

F. APPLICATIONS : α-GLUCOSIDASES et GLYCÉMIE CHEZ DES ABEILLES NOURRIES ARTIFICIELLEMENT

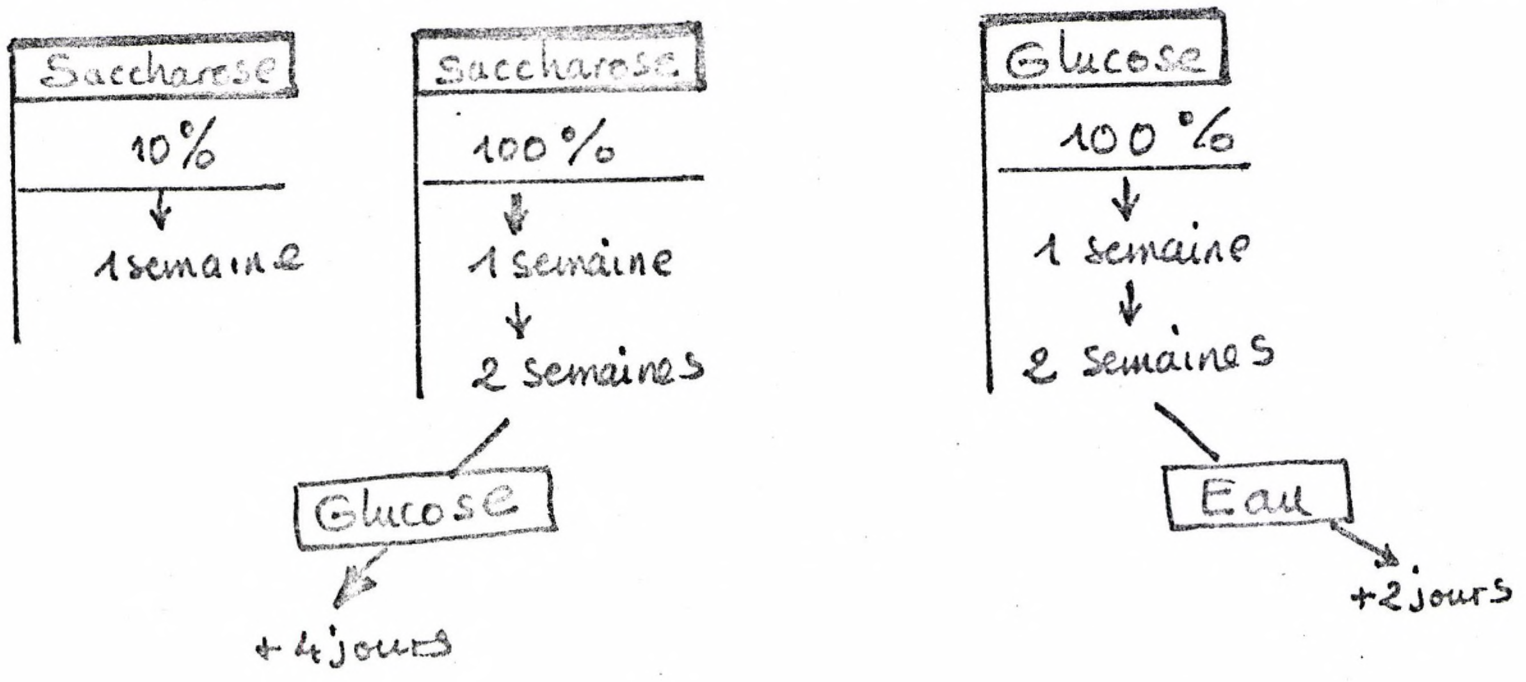
Principe des expériences.

Des abeilles naissantes de la colonie 767 ont été placées en cagettes et nourries au moyen de solutions sucrées :

- Saccharose pur, à 100% dans l'eau distillée
- Saccharose commercial : même concentration.
- Saccharose dilué à 10%.
- Glucose pur, à 80% dans l'eau distillée

L'étude des paramètres cinétiques et de la glycémie a été réalisée après 7j et 15j d'élevage.

Après comparaison des lots élevés sur saccharose et sur glucose, le lot "saccharose" a été placé pendant 4 j sur glucose, tandis que le lot "Glucose" a été placé sur eau pure, ceci dans le but d'analyser les modifications induites par la glycémie résultant des divers modes de nourrissement.



1° Abeilles nourries sur sirops (10-100%) de Saccharose.

1ère série : Saccharose pur.

- Courbe de saturation directe.

Paramètres :	1 semaine	2 semaines
VM nmoles/mn/µl	2,48	4,78
K mM	4,96	3,85
n	1,017	0,904

- Influence du Glucose (1 semaine)

pour S = 3 mM $\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 50 mM

- Courbe de saturation avec inhibition (1 semaine)

Avec 50 mM de Glucose introduit :

VM = 2,30 nmoles/mn/µl

K = 8,94 mM

n = 0,849

(fig. 27a) : 7 j
(fig. 28) : 15 j

2e série : Saccharose commercial :

- Courbe de saturation directe (2 séries)

VM = 1,90 nmoles/mn/µl

K = 4,90 mM

n = 0,960

- Influence du Glucose : pour S = 3,6 mM $\frac{V_0}{2}$ obtenue avec 75 mM.

- Courbe de saturation avec inhibition.

Avec 50 mM de glucose :

VM = 1,90

K = 7,11

n = 0,887

(fig. 29)

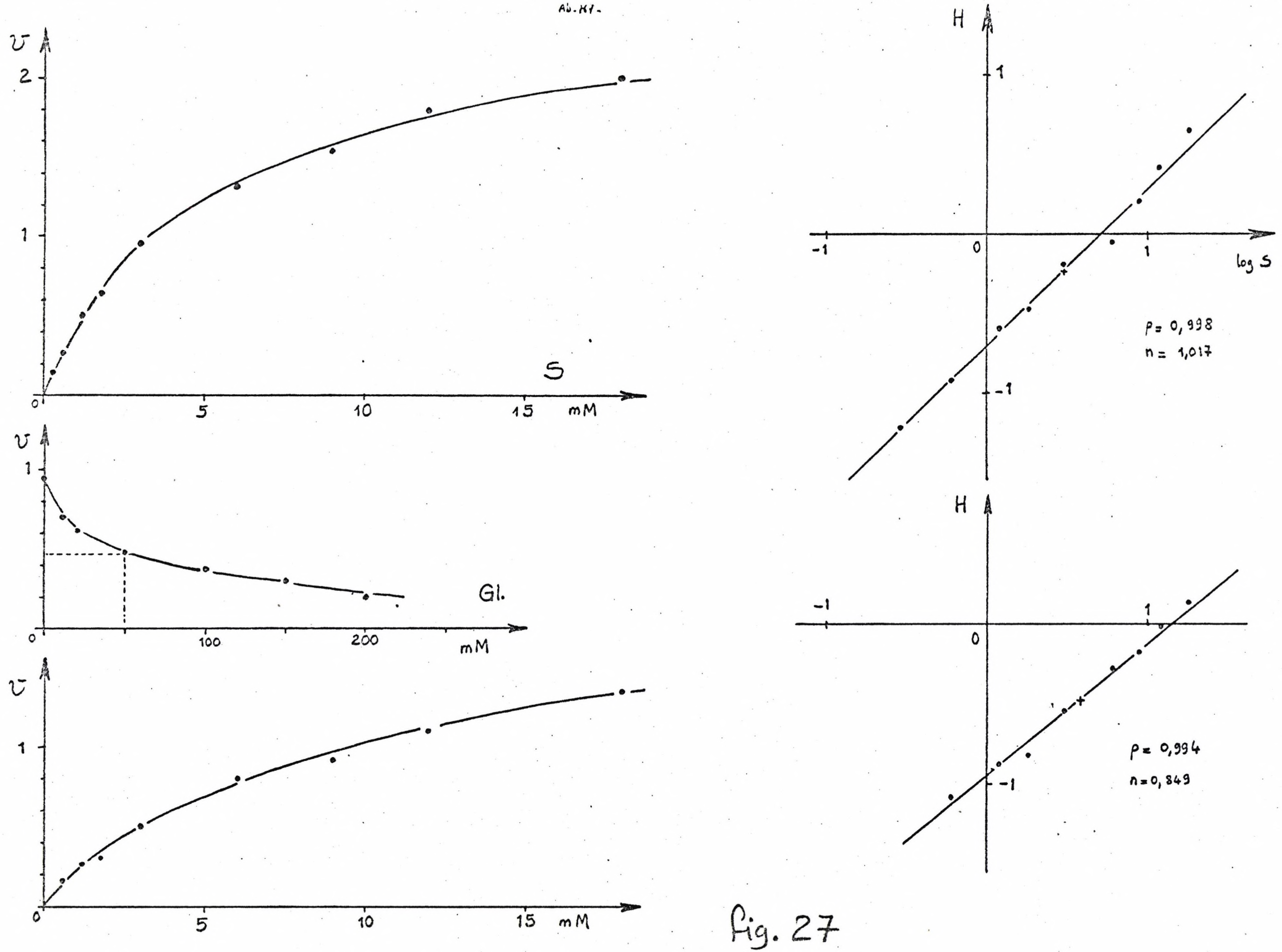

v
2
1
S
0
5
10
15
mM
v
1
Gl.
0
100
200
mM
v
1
0
5
10
15
mM
H
1
-1
0
1
log S
-1
ρ= 0,998
n= 1,017
H
-1
1
0
-1
ρ= 0,994
n=0,849

fig. 27

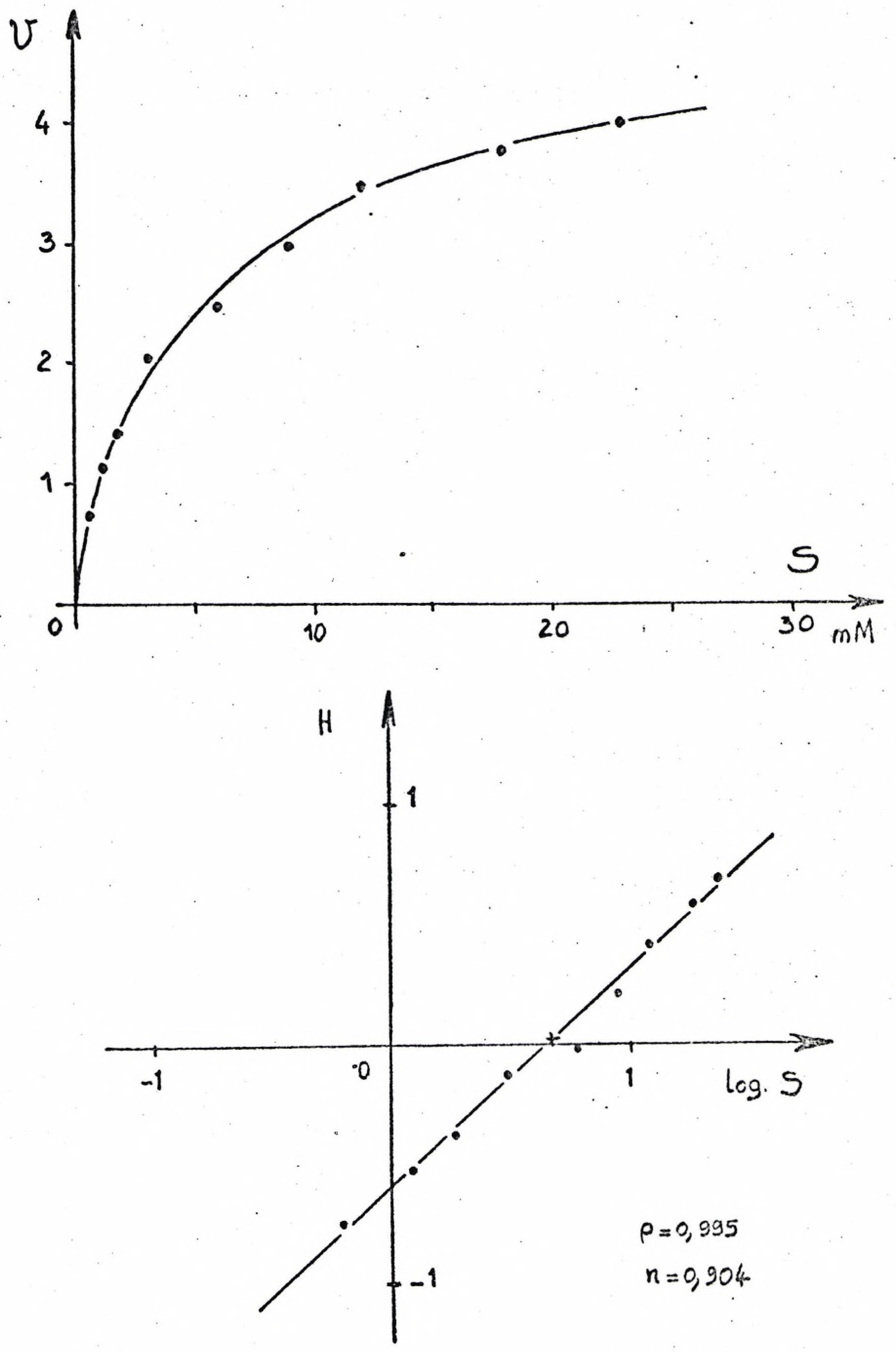
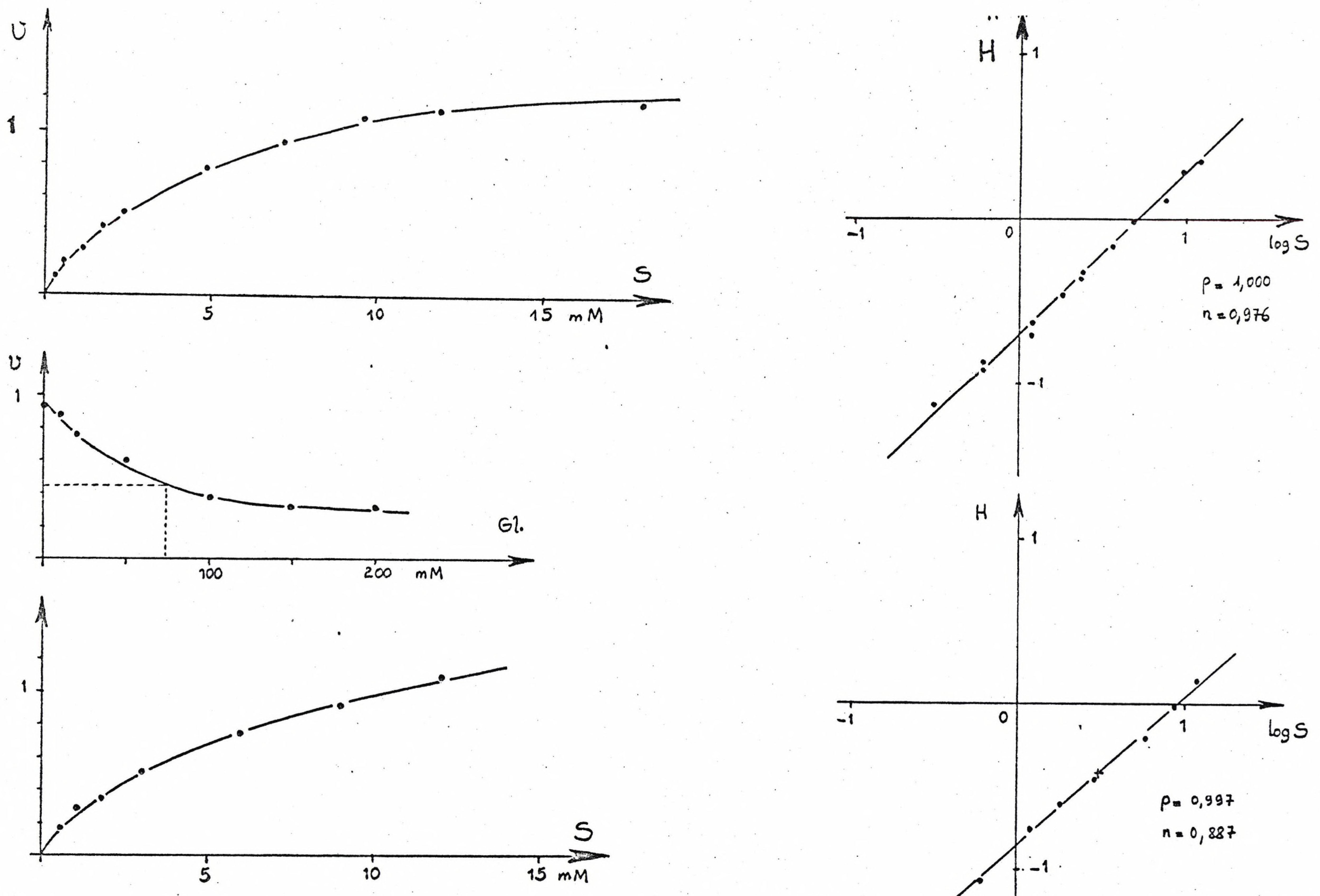


Fig. 28 -



v
1
S
5
10
15 mM
v
1
Gl.
100
200 mM
1
S
5
10
15 mM
H
1
-1
0
1
log S
ρ = 1,000
n = 0,976
-1
H
1
-1
0
1
log S
ρ = 0,997
n = 0,887
-1

fig. 29

3e Série Nourrissement sur saccharose à 10% (1 semaine)

- Courbe de saturation directe. (2 séries)

$V_M = 1,41$ nmoles/mn/µl

$K = 3,35$ mM

$n = 1,015$

- Influence du glucose

Avec $S = 3$ mM : $\frac{V_0}{2}$ obtenue pour 90 mM ajoutées.

- Courbe de saturation avec inhibition

En présence de 100 mM de glucose :

$V_M = 1,42$ nmoles/mn/µl

$K = 11,07$ mM

$n = 0,875$ (fig. 30)

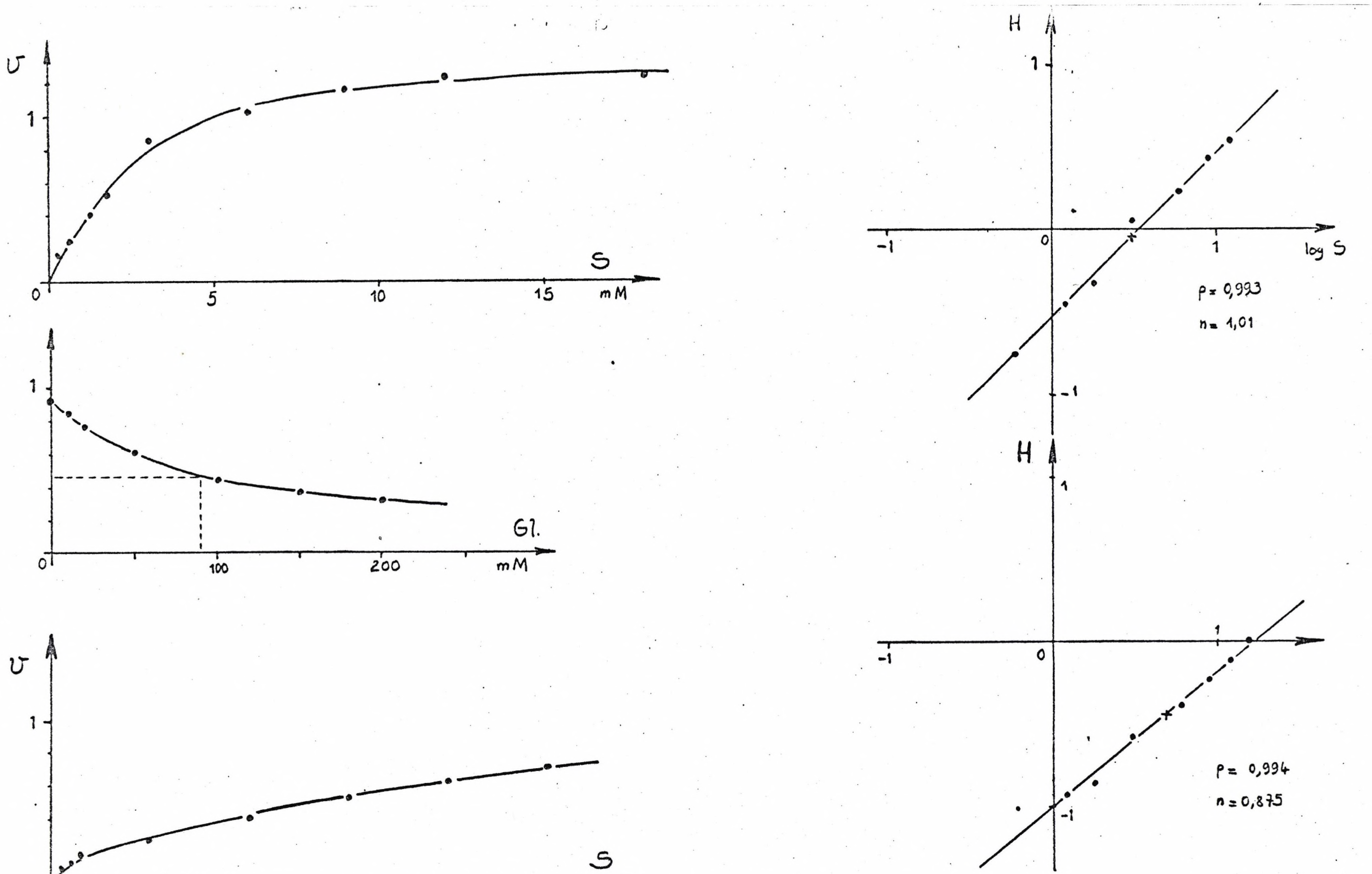
. Glycémies mesurées dans les mêmes extraits :

- Résultats en mM (Ecarts types) - N=3

Expériences :	Tréhalose	Saccharose	Glucose	Fructose
Sacch. 100%				
1 semaine	43,60 (8,168)	31,3 (26,75)	46,80 (9,32)	72,00 (19,05)
2 semaines	80,00 (14,14)	11,00 (5,37)	38,00 (10,18)	73,30 (32,10)
Sacch. 100% (Commercial)	34,80 (11,88)	135,6 (3,39)	82,4 (14,71)	83,4 (19,52)
Sacch. 10%	33,87 (0,61)	4,80 (3,46)	9,00 (0,35)	15,48 (1,14)

Glycémie Naturelle intermédiaire entre naissantes et butineuses :

	Tréhalose	Saccharose	Glucose	Fructose
→	28,65	0	12,75	4,75



v
1
S
0
5
10
15
mM
1
Gl.
0
100
200
mM
v
1
S
0
5
10
15 mM
H
1
-1
0
1
log S
ρ = 0,993
n = 1,01
-1
H
1
-1
0
1
ρ = 0,994
n = 0,875
-1

Fig. 30

2° Abeilles nourries sur sirop de Glucose. (80%)

(fig. 31) : 7j
(et 32) : 15j

• Courbes de saturation directes.

paramètres :	1 semaine	2 semaines
VM nmoles/mn/µl	1,565	1,386
K mM	3,88	3,36
n	0,918	0,96

• Influence du glucose : (1 semaine)

pour S = 3 mM : $\frac{V_0}{2}$ obtenue en ajoutant 100 mM

• Courbe de saturation avec inhibition – (1 semaine)

En présence de 60 mM de glucose introduit in vitro :

VM = 1,49 nmoles/mn par µl

K = 11,44 mM

n = 1,065

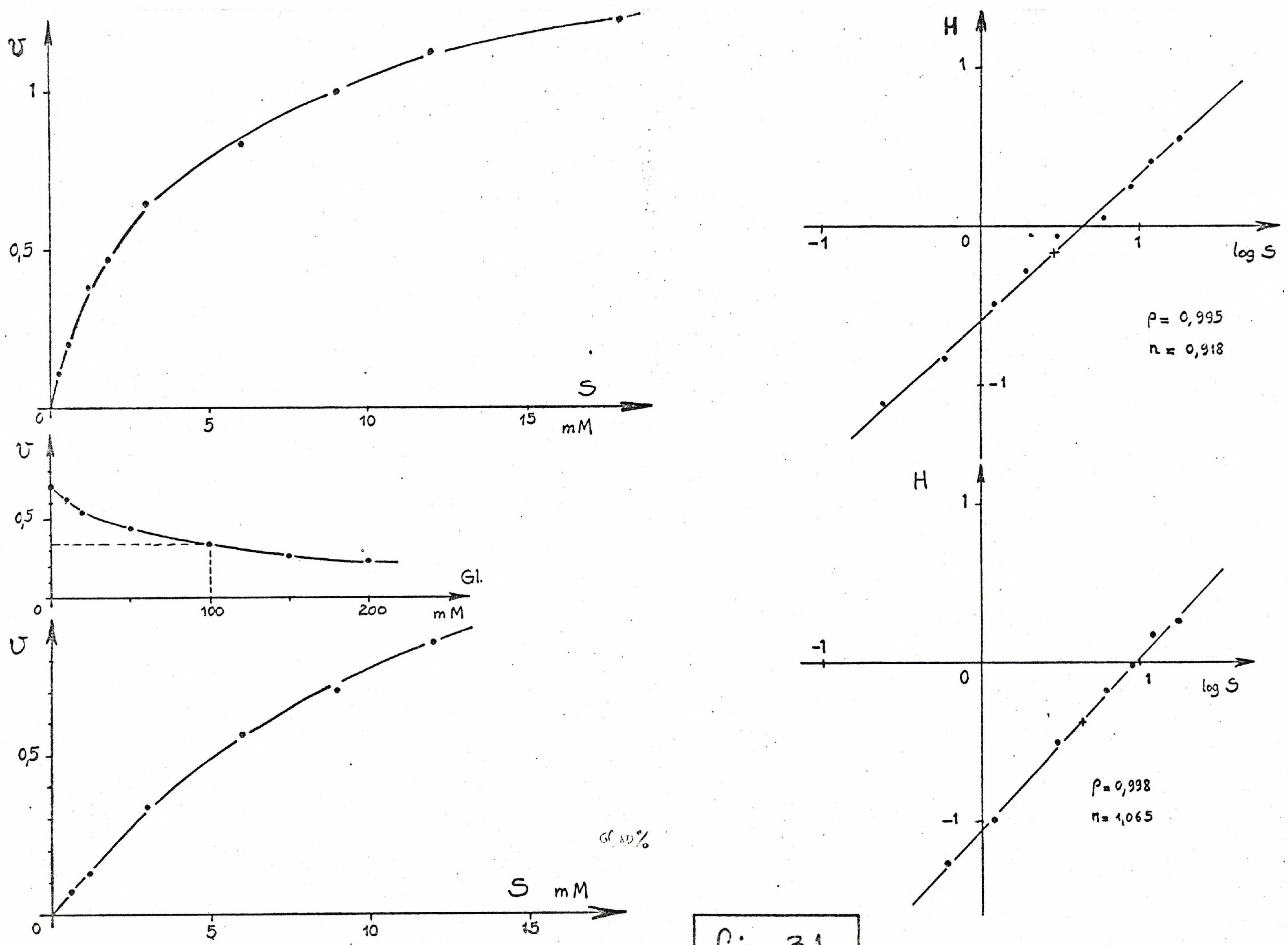
(Avec l'élevage sur glucose, n augmente dans le cas de l'inhibition par apport de glucose in vitro ...)

• Influence du glucose in vitro en fonction de la dilution de l'extrait enzymatique (2 semaines).

avec S = 3 mM et des prises d'essais différentes :

Prise d'essai.	dose donnant $\frac{V_0}{2}$
0,5 µl	68 mM
1 µl	65 mM
2 µl	62 mM

(La dilution in vitro ne change pratiquement pas le résultat)
(fig. 3.3)



v
1
0,5
S
0
5
10
15
mM
v
0,5
Gl.
0
100
200
mM
v
0,5
S mM
0
5
10
15
H
1
-1
0
1
log S
-1
ρ = 0,995
n = 0,918
H
1
-1
0
1
log S
-1
ρ = 0,998
n = 1,065

fig. 31

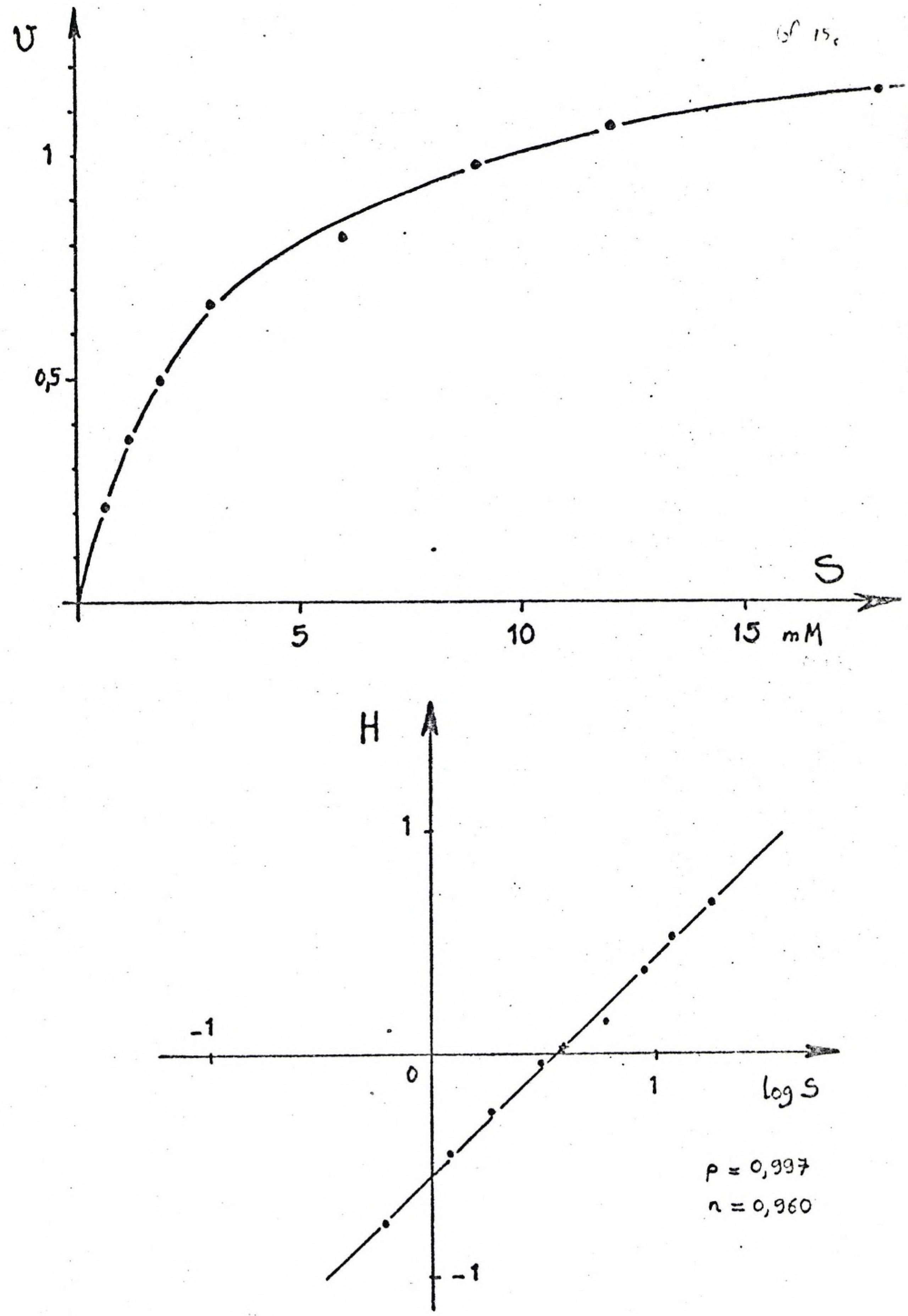


fig. 32

• Glycémies Correspondantes

Concentrations en mM dans les extraits enzymatiques

	Tréhalose	Saccharose	Glucose	Fructose
1 semaine	48,4	5,3	128	3,6
2 semaines	49,2	0,3	19,1	0,7

Comme précédemment, la tréhalosémie reste très stable, tandis que la glycémie, d'abord considérable est ensuite réduite. (régulation à effet lent ?)

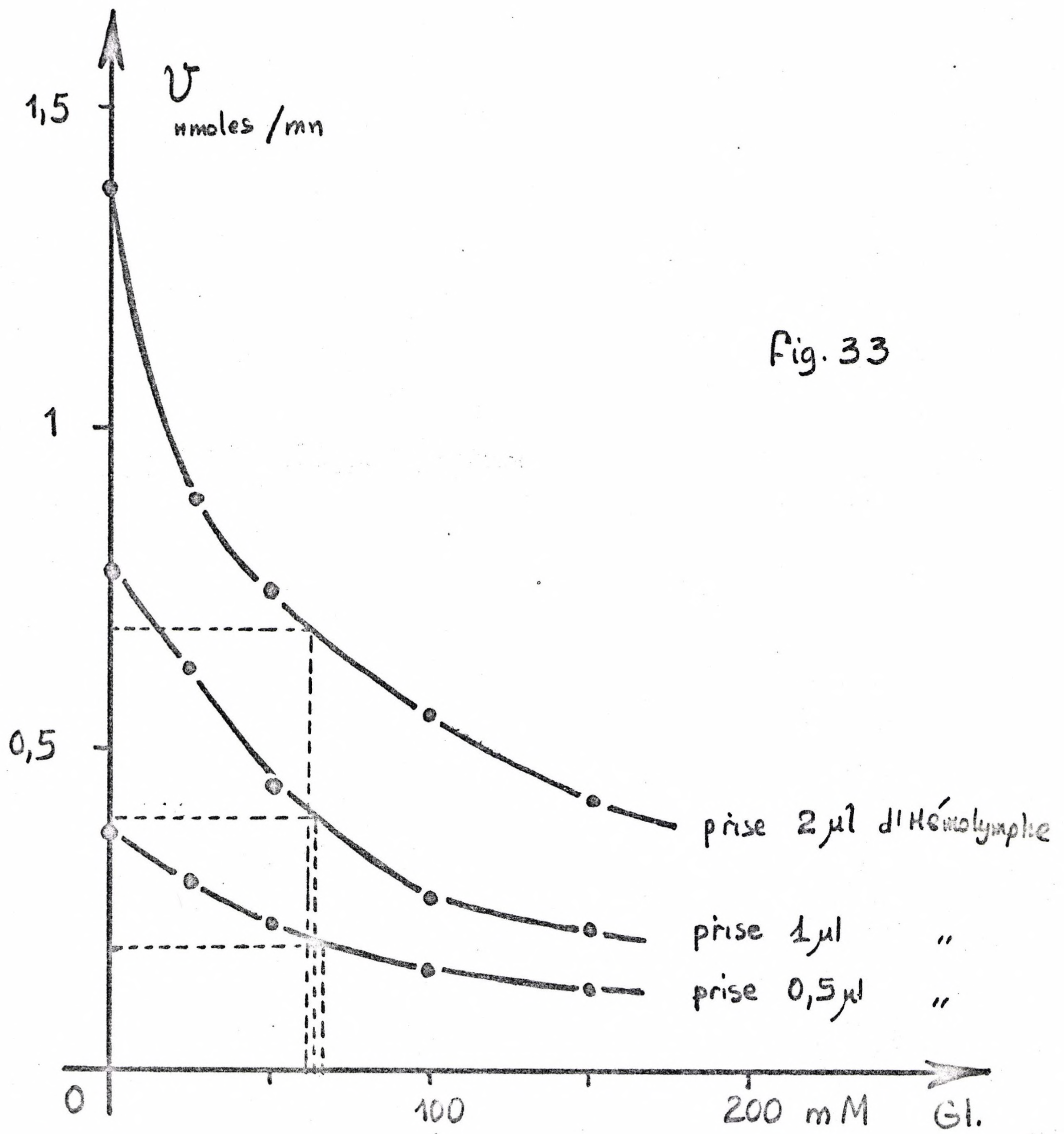


Fig. 33

3° transition du glucose à l'eau distillée

Sur la cagette des abeilles élevées 15 j sur glucose, celui-ci est remplacé par de l'eau distillée et les paramètres enzymatiques et glycémiques mesurés au bout de 24 H (début de mortalité)

• Courbe de saturation directe.

V_M = 1,48 nmoles / mn / µl (inchangée)

K = 3,35 mM (légèrement augmentée)

n = 1,01 (" ") (fig. 32)

• Glycémie correspondante :

Trehalose :	45,2 mM
Saccharose :	0,44 mM
Glucose :	7,8 mM
Fructose :	0,83 mM

On observe une baisse de la glucosémie sans changement de la vitesse maximum de l'enzyme, mais avec une meilleure efficacité donnée par l'évolution de n et de K. Cependant, le délai de 24 H doit être insuffisant pour induire une adaptation plus poussée à l'absence de glucose dans la nourriture.

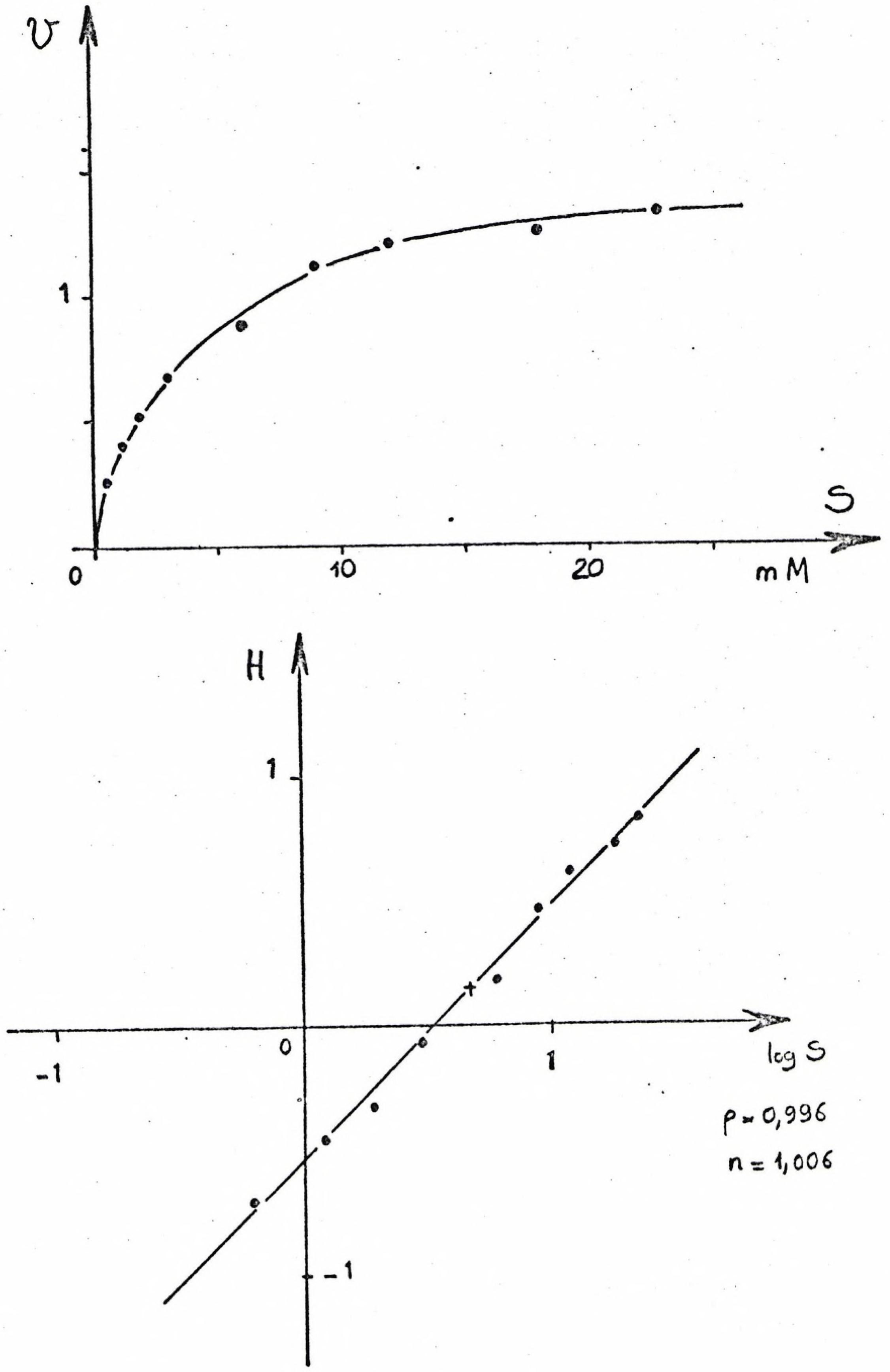


fig. 32.

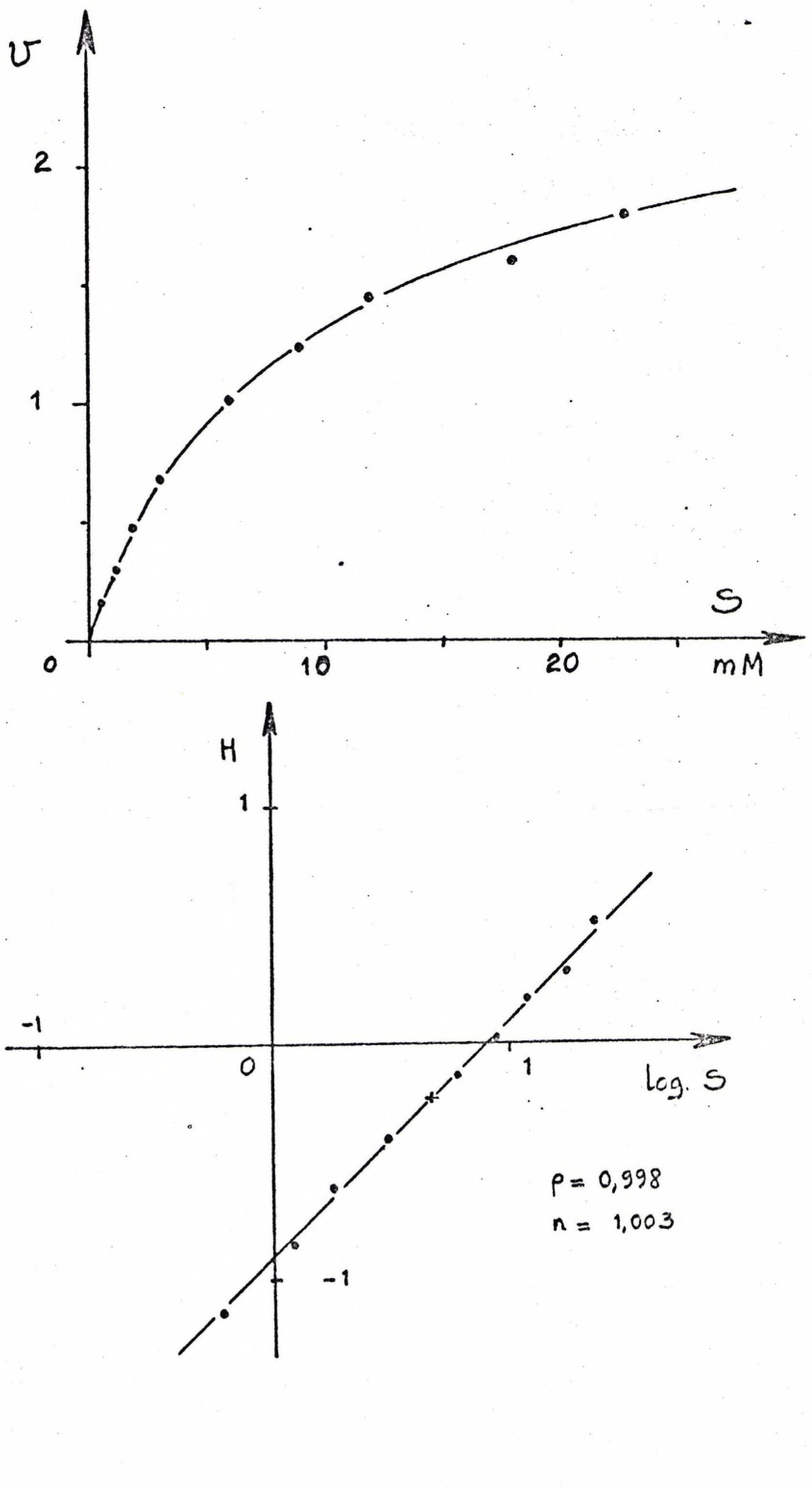


fig. 33

4° Transfert sur glucose des Elevages préalablement maintenus sur Saccharose.

Après 15 j sur sirop de Saccharose 100%, les abeilles sont placées 4 j. sur sirop de glucose 100 %.

(Fig. 33)

- Courbe de saturation directe :

V_M =	2,4 nmoles/mn/µl	(baisse importante)
K =	7,90	(augmentation importante)
n =	1,00	(augmentation de 10%)

- Glycémie correspondante :

Tréhalose :	78,8 mM	(inchangé)
Saccharose :	0	(chute !)
Glucose :	30,8 mM	(peu changé)
Fructose :	6,8 mM	(baisse importante).

Le saccharose disparaît et la fructosémie baisse, tandis que les teneurs en tréhalose et glucose varient peu.

Cependant, les propriétés de l'enzyme ont été modifiées et de nouveau adaptées à la situation : V_M diminuée, et affinité pour le substrat réduite (*), puisque le glucose se trouve maintenant disponible dans la nourriture.

(*) conforme à l'inhibition par le glucose.

5º Brève discussion.

Plusieurs éléments montrent l'adaptabilité des propriétés cinétiques de l'α glucosidase, en fonction des conditions de nourrissement : il semble qu'un délai d'induction de plusieurs jours soit nécessaire

La glycémie subit fortement le contre-coup du nourrissement, excepté la trehalosémie, remarquablement stable (probablement régulée à l'échelle de sa biosynthèse)

Les teneurs en saccharose, glucose et fructose sont anormalement élevées au cours de la première semaine d'élevage sur sirops à 100% ; elles sont ramenées à des valeurs plus proches de la normale au bout d'un délai supplémentaire de plusieurs jours : l'Abeille fournit un effort de régulation dont on peut se demander s'il ne lui est pas préjudiciable sous certains aspects, en particulier lorsqu'on se souvient que le saccharose est lui-même un inhibiteur (probablement non compétitif) des α glucosidases.

Il paraît exister, en définitive, une régulation de la glycémie, et le chapitre suivant va tenter d'en illustrer un autre aspect dynamique, de courte durée cette fois.

G. RECHERCHES SUR LA STABILITÉ DE LA GLYCÉMIE - (Résumé)

Au cours d'expériences enzymologiques, l'analyse des glucides effectuée sur des prélèvements successifs dans l'extrait d'hémolymphe a montré une variation de concentration en glucose, parfois au détriment du tréhalose (travail des glucosidases), et ceci bien que la solution soit maintenue dans un bain-marie à 0°c

1° Principe des expériences.

À divers stades du développement des nymphes (No et N6) l'évolution de la composition glucidique de l'hémolymphe a été comparée dans le cas : 1) d'hémolymphe extraite et conservée in vitro.

2) d'hémolymphe prélevée aux mêmes moments in vivo.

L'extrait in vitro, ainsi que des insectes vivants choisis rigoureusement au même stade ont été conservés au même endroit, à une même température (28 ± 1°c).

À partir du temps To (prélèvement initial de l'extrait in vitro et 1er point in vivo), des prises d'essais et des ponctions sont effectuées de 20 en 20 mn et soumises à l'analyse des glucides par micro chromatographie en couche mince.

Les résultats préliminaires ainsi que les dernières séries bénéficiant d'une plus grande précision d'analyse sont indiqués successivement.

2° Observations préliminaires : évolution de la glycémie in vitro.

Les résultats suivants proviennent d'extraits d'hémolymphe conservés à 0°c pour étude des cinétiques glucosidasiques.

a) Nymphes blanches (No) : concentrations en mM

Temps	Tréhalose	Glucose	Fructose	Sucre "H" (Ose à faible P.M.)
To :	21,5	38	0,04	1,05
To + 1H30 :	1,5	52	0,07	0,34

b) Nymphes à yeux violets (N 3 à N4).

Temps	Tréhalose	Glucose	Fructose	"H"
To	29,2	103	...	1,1
To + 1H30	16,2	270	...	1,8

c) Nymphes brunes (N4 à N5).

Temps	Tréhalose	Glucose	"H"
To	32	40	0,25
To + 1H 30	35,8	49,3	0,13

d) Larves 5e stade (L5)

conditions :	Tréhalose	Glucose	Fructose
To	48	2,8	1,0
To + 120 mn in vitro	44	9,1	1,4
To + 120 mn in vivo	50	5,1	0,84

e) Naissantes au

Temps To ----	42	6,8	0,40
To + 30mn	24	9,0	0,15

3° Comparaison de la dynamique d'évolution de la glycémie in vitro et in vivo.

a) Essai préliminaire sur nymphes brunes (N5)

• Evolution in vivo

Temps	Tréhalose (mM)	Glucose (mM)
To	32	6,2
To + 20mn	47	3,6
40mn	51	6,4
60 mn ...	39	5,6
90 mn ...	47,2	6,8
120 mn	37,6	8,4

• Evolution in vitro

Temps	Tréhalose (mM)	Glucose (mM)
To	41	22
To + 20 mn ...	40	23
40 mn ...	42	33
60 mn ...	30	30,4
90 mn	32	67,8
120 mn ...	30,4	60,8

In vitro, Au bout d'1 heure, le glucose commence à être libéré tandis que du tréhalose disparaît - (-11 mM de celui-ci, +38 mM du premier) - Mais in vivo les concentrations sont stables.

b) Essais sur Nymphes blanches (N0)

Temps mn	Evolution in vitro Tréhalose mM	Glucose mM	Evolution in vivo Tréhalose mM	Glucose mM
0	6	10,8	6,8	11,88
20	0,12	38,4	43,8 80,8	6,24
40	0,024	41,6	32	4,26
60	0	32	24,8	5,6
90	0	36,8	37,6	20,8
120	0	37,6	33,6	2,72

c) Essais sur Nymphes brun foncé (N6)

Temps mn	Evolution in vitro Tréhalose mM	Glucose mM	Evolution in vivo Tréhalose mM	Glucose mM
0	~~48,4~~ 67,60	7,4	~~86,8~~ 67,60	14,0
30	54,0	16	60,0	5,6
60	40,8	37,2	64,8	4,8
90	31,2	41,1	61,2	4,4
130	29,6	66,0	48,8	4,4
160	26,8	103,2	44,8	5,6

L'α-glucosidase hydrolyse le tréhalose in vitro et libère du glucose (sans toujours en expliquer toute la quantité apparue).

Par contre, les prélèvements in vivo montrent une plus grande stabilité : le vivant régule, probablement aidé par un certain équilibre entre biosynthèse et dégradation.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES.

- L'α-glucosidase est rétro-inhibée par le glucose qu'elle libère elle-même.
- L'hémolymphe extraite et conservée hors de l'animal voit ses réserves glucidiques hydrolysées, tandis que dans le corps de l'animal vivant, sa composition demeure stable, toutes conditions égales par ailleurs.
- Les anomalies glycémiques induites par l'administration aux Abeilles de sirops très concentrés sont corrigées au bout de 15 jours.
- Parallèlement, les paramètres cinétiques de l'α-glucosidase s'adaptent aux possibilités offertes par le milieu nutritif.

Ces divers éléments plaident en faveur de l'existence d'un mécanisme de régulation de la glycémie – fût-il sommaire – chez l'Abeille (il serait plutôt lent qu'imprécis !...)

Le résultat de son action se traduit par une Tréhalosémie remarquablement stable, ~~alors~~ que la concentration en glucose peut être soumise à de très grandes variations (naturelles ou induites).

Il serait intéressant – et utile – de comparer la glycémie et l'activité glucosidasique chez des ruches présentant des différences de rendement (le miel est une production dont on connaît les objectifs sans disposer de critères de sélection !). L'étude du système iso-enzymatique correspondant et de son déterminisme génétique apporterait également de précieux renseignements, aussi bien sur le plan biochimique pur, que dans le domaine de la génétique des populations, au cas où des polymorphismes seraient caractérisés. (cf. chap. VI)

Enfin, l'étude du rôle du saccharose sur l'α-glucosidase, puis l'analyse des β glucosidases seraient à envisager sérieusement.

CHAPITRE VI

UTILISATION DES ISO-ENZYMES EN GÉNÉTIQUE.

① Génétique de l'Abeille.

Le programme abordé par M. CORNUET a été repris au moyen de la technique d'électrophorèse sur gel en plaques avec gradient d'acrylamide, grâce à un appareillage récemment arrivé au laboratoire.

Le système acétyl-estérasique a été analysé chez les larves et les naissantes, avec des résultats techniques plus complets que ceux précédemment décrits dans la littérature (au moins 3 à 4 isozymes contre 1 seule bande connue jusqu'ici)

L'étude se poursuit maintenant au stade de l'exploitation génétique (comparaison des colonies, descendances etc...)

② Génétique des noctuelles.

On prevoit une approche préalable sous forme de zymogramme puis une recherche d'isozymes à partir des enzymes les plus actives.

Une partie de l'appareillage destiné ultérieurement à M. POITOUT a déjà été acquis grace à une exploitation adéquate des difficultés de la livre Sterling au moment des commandes.

③ Projets -

L'ensemble des travaux sur les α-glucosidases mériterait une étude biochimique plus poussée des isozymes et de leur éventuel déterminisme génétique.

La part du déterminisme biochimique vis à vis des mécanismes génétiques – et réciproquement – présente un double intérêt pour le généticien et pour le biochimiste.

Si la nature des systèmes α-glucosidasiques le justifiait, il paraîtrait opportun d'orienter les travaux de génétique de l'Abeille au moins en partie dans cette voie, déjà bien préparée du point de vue biochimique.

Deuxième Partie

RAPPORT ADMINISTRATIF

et

RAPPORT MORAL

CHAPITRE I

BILAN BUDGETAIRE DU SEMESTRE

① Dépenses d'Equipement

a_ L'engagement de dépense transmis par le "Canal-Apiculture" comportait 3 postes pour une somme totale de : 22.500 F

Les achats ont été opérés comme suit :

Designation	coût
Armoire de Réfrigération et congélation :	5930,00
Ensemble d'Electrophorèse sur gradient ...	8754,00 (*)
Alimentation régulée en tension/intensité ...	3210,80
Pompe à vide secondaire pour lyophilisation ..	4554,00
[Chapitre clos pour 1975] Total T.T.C.	22448,80

(*) L'utilisation des fluctuations monétaires a permis ici d'acquérir deux cellules de base pour le même prix, en prévision de la mise en route courant 1976 d'une unité d'électrophorèse destinée aux noctuelles.

b_ Attributions extérieures.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'Agronomie, une dépense d'équipements et accessoires de chromatographie en phase gazeuse a été opérée sur crédits extérieurs. Engagement T.T.C. : 2.300 F

② Dépenses de Fonctionnement

Chapitre de dépenses	origine des crédits	
	Apiculture	zoologie
Missions (1)	–	1700 *
Fournitures de Bureau ...,	150 *	–
Affranchissement	64,10	–
Produits chimiques	1320	–
Matériel de Laboratoire ..	1900	–
Ouvrages	–	–
Tirés à part		70 *
Total :	3 434	1770

* Relevés provisoires, dans l'attente des décomptes exacts (nombres arrondis à une valeur supérieure).

Engagement total du semestre :(2) 5 204 F –

[NB : Prévision par Chercheur 1975 : $\frac{11027}{2}$ = 5513 F par semestre]

(1) y compris le remboursement du déplacement au conseil de Dépt à LYON du 27/5 refusé par la station de Zoologie.

(2) y compris les dépenses de laboratoire destinées aux travaux de M. CORNUET (produits chimiques essentiellt.)

③ Prévisions pour le 2e Semestre

Bibliothèque : Ouvrages *	2 000,00
Produits chimiques	1 500,00
Matériel de laboratoire	1 000,00
Divers	500,00
Total :	5 000,00

* total annuel légèrement supérieur aux prévisions du fait de retard dans les achats prévus antérieurement.

CHAPITRE II

RAPPORT MORAL ET PROSPECTIF

① A propos de la mission du laboratoire de Biochimie

• Vocation personnelle du laboratoire

La nutrition et le métabolisme des insectes sont encore mal connus sur le plan des mécanismes de régulation, dont l'éfficacité constitue cependant l'un des facteurs les plus importants de la survie et du développement des animaux placés en conditions artificielles (donc anormales), qu'il s'agisse de l'élevage des phytophages ou de celui d'entomophages.

Un laboratoire de "Biochimie Dynamique" peut apporter dans ce domaine plutôt fondamental (un "Mal nécessaire" en Recherche orientée) une contribution originale débouchant sur des applications agronomiques concrètes, puisqu'entièrement motivée — précisément — par les problèmes agronomiques eux-mêmes.

...

• Contributions extérieures "ponctuelles" du laboratoire

La recherche biochimique évolue avec une telle rapidité qu'un laboratoire travaillant dans ce domaine ne peut être que "de pointe" ou "de routine."

Ainsi, lorsque les généticiens ou les nutritionnistes sont confrontés avec des problèmes biochimiques, ils sont en droit d'attendre de celui qui les aide momentanément une contribution établie sur des données aussi originales que possible et d'une portée scientifique suffisante pour permettre une exploitation courante de longue durée.

• Tout ceci exige du Laboratoire une polyvalence efficace et rapide. Mais la nécessité de faire face rapidement à des problèmes nouveaux ne doit en aucun cas entraîner le risque d'un survol expérimental, au détriment de la rigueur et de la solidité des démarches scientifiques (pas plus que de celles-ci acquises au prix d'un allègre stakhanovisme, insoutenable à long terme.).

Trois conditions semblent devoir présider au succès de l'entreprise :

- Un équipement adéquat : condition en bonne voie de réalisation.
- Une équipe "de choc" polyvalente, d'effectif <u>limité</u> mais <u>suffisant</u> :
  - présente mais quand même un peu réduite, pour l'instant...
- Une parfaite sérénité dans le travail : seule condition non réalisée, du fait de l'inexistence administrative du laboratoire, dont la situation et le fonctionnement sont soumis à trop d'incertitudes et d'intermédiaires (si j'osais : "De la sérénité naît la pérennité... et réciproquement.")

---

② Les difficultés rencontrées

• **Mise à disposition de matériel au profit de Chercheurs du Département**

Par suite du départ de M. CORNUET aux Antilles, une fraction du matériel d'électrophorèse suivra et ne reviendra qu'après réalisation de copies, afin que soit assurée la continuité du travail.

Une partie du même appareillage en cours de mise en oeuvre pour la génétique des noctuelles n'a pu être acquise (catég. fonctionn.t), la Station de Zoologie n'ayant pas donné suite à la Demande d'Achat :

• **Disponibilité des Crédits de Fonctionnement.**

La Station de Zoologie ayant également refusé le remboursement des frais de mission au Conseil de Dépt de Zoologie tenu à LYON le 27 mai, la somme avancée reste due.

- Afin de couper court à toute tentative extérieure de polémique, aucune demande d'achat ne sera désormais transmise à la Station de Zoologie d'Avignon. (En 1974, déjà, celle-ci avait épuisé les crédits annuels au mois de juillet, et les dépenses du laboratoire de biochimie pour le 2e semestre - soit 50% de l'engagement annuel - avaient été supportées par l'Apiculture)

• **Continuité à assurer dans le déroulement des programmes**

Le taux de saturation maximum de l'équipe, annoncé en 1974, se maintient solidement, ce qui apporte une réelle satisfaction d'esprit. Cependant, l'absence de collaborateurs de niveau élevé oblige, cette année encore, le responsable du laboratoire à assurer une présence permanente " à la paillasse " devenue préjudiciable physiquement et moralement, et compromet tout au long de l'année certains aspects du travail tels que : le temps de réflexion sur les résultats, la bibliographie, la rédaction...

• Inconvénients inhérents à l'état de "Fantôme"

Bien que fonctionnant pour l'instant dans un état de semi-clandestinité, le laboratoire de Biochimie n'en constitue pas moins une entité autonome et productive, et subit les inconvénients de son état actuel ; ainsi :

- qui n'existe pas n'a pas à être informé des coupures d'effluents (eau, electricité) dont les conséquences peuvent être extrêmement graves, voire dangereuses.
- Absence de participation officielle aux travaux INRA d'intérêt général tels que : Commission de Biochimie ! (N'existant pas, le laboratoire ne reçoit aucune information directe)
- Incertitude d'avenir pour l'aménagement fonctionnel du Laboratoire : où sera-t-on installé "définitivement" ? Faut-il, dans l'attente, éliminer tout projet d'adaptation : par exemple, pour l'usage des molécules marquées, pour l'accueil de Stagiaires INRA et Universitaires de niveau élevé ...
- Les exigences de discipline extérieure ne sont pas prises en considération : ne pas fumer, ne pas déranger inutilement le personnel en cours de manipulations ; n'importe qui n'ayant pas à venir faire ou emprunter n'importe quoi sans accord préalable, fiches à remplir etc...
  (Or, un fantôme contraint à des manifestations d'autorité paraît soit méchant, soit ridicule ...)
- etc.

Près de 3 années de fonctionnement, avec les difficultés rencontrées mais aussi les résultats acquis, constituent maintenant une expérience suffisante pour permettre un examen objectif de l'avenir concret du laboratoire, pour lequel un certain nombre de propositions peuvent être dégagées.

...

③ Formulations prospectives.

Le Laboratoire de Biochimie est appelé à travailler en liaison fréquente avec différentes unités du Département de Zoologie, et parfois avec d'autres secteurs (INRA et Universitaires). Les opérations nécessaires à la poursuite du travail (et en particulier les dépenses) devront pouvoir être effectuées normalement, dans l'avenir, en temps opportun, c'est à dire en fonction du déroulement du programme ... et de l'évolution des prix.

Les demandes formulées ci-dessous ont pour double objectif d'améliorer sensiblement l'efficacité des recherches, tout en les replaçant dans des conditions de travail normales.

Elles aboutissent à une image théorique de ce que devrait être le laboratoire au complet pour une durée assez longue.

Demandes pour 1975

1º Remboursement des frais de mission avancés en Mai ... 217 F

2º Attribution d'un crédit de fonctionnement (2e semestre) destiné à l'achat :
- de réactifs chimiques pour électophorèse .... 501 F
- de 2 coffrets APIZYM pour analyse enzymologique .... 466 F
- de 5 microseringues (en remplacement d'unités actuellement hors d'usage, fournies au départ à titre personnel) ... 717,60 F

(Total : 1 901,60)

3º Attribution d'un crédit spécial sur le chapitre "Bibliothèque" pour l'acquisition d'ouvrages de première nécessité : ...... 2073 F

* Les demandes d'achat portant indication précise de tous les éléments nécessaires sont jointes en annexe (Motivation, fournisseurs, références, prix, état d'engagement antérieur de dépense dans le même chapitre)

...

Demandes pour 1976

1° L'attribution d'une ligne budgétaire propre au laboratoire (comme suite à la confirmation officielle de son existence)

2° Un poste de Technicien supérieur, niveau I.U.T. ou équivalent pour participation aux recherches sur les lipides et aux divers travaux de chromatographie en phase gazeuse.

3° Une aide à mi-temps pour les questions de dactylographie, venant au secours de Madame BOUNIAS jusqu'ici Secrétaire bénévole de l'Administration (ou mieux : la consécration de ses fonctions par un contrat).

4° Une aide à temps (provisoirement) partiel pour des travaux délicats de nettoyage et entretien spécialisé (plus économique que de remplacer régulièrement des pièces cassées, avec pertes de temps, augmentations des prix etc.)

Demandes pour 1977

- Un poste de scientifique (ou ingénieur) assisté d'un poste d'aide technique avec pour mission d'approfondir par <u>monographies</u> successives les découvertes intéressantes mais insuffisamment exploitées faute ... de temps et de personnel.

Demande pour ... le plus tôt possible

- Réajustement du classement administratif du responsable du laboratoire (dont les difficultés financières croissent en dépit d'une gestion familiale particulièrement austère)

CONCLUSION

Les travaux scientifiques présentés dans ce rapport ne constituent pas des actes gratuits.

L'étude de vitamines dans les milieux d'élevage, celle des protéines de l'Abeille ou des Noctuelles, l'analyse des processus de contrôle de la glycémie chez un insecte producteur ... de sucre, bientôt les lipides et le métabolisme énergétique chez des ravageurs migrants ou sédentaires, avec ou sans diapause ... constituent autant de sujets biochimiques presque fondamentaux, et qui, pourtant, ont été – faut-il le répéter – motivés et suscités par des objectifs agronomiques! (Meilleure connaissance de la biologie des ravageurs afin de prévoir ou contrôler leurs attaques, élevage d'insectes-hôtes destinés eux-mêmes à la production de parasites à introduire etc. etc.).

La création d'un laboratoire hautement spécialisé en biochimie pure résultait donc d'une évolution logique et de la nécessité apparue depuis plusieurs années d'approfondir certains aspects de la Recherche Zoologique dans cette direction précise.

Les premiers pas ont été accomplis, les premiers obstacles franchis (peut-être les plus difficiles) : il s'agit maintenant de permettre au nouveau Service de s'épanouir dans une pleine efficacité, basée en particulier sur des conditions d'existence stables et sereines.

Cantarel-Montfavet,
du 28/7 au 12/8 1975

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
I.N.R.A.
DÉPARTEMENT DE ZOOLOGIE
Laboratoire de Biochimie
C. R. A. D'AVIGNON
84140 CANTAREL-MONTFAVET

BIBLIOGRAPHIE DU LABORATOIRE
POUR LE PREMIER SEMESTRE 1975

BOUNIAS, M. 1975 - Détermination quantitative par électrophorèse en gel de polyacrylamide des principales fractions protéiques de l'Hémolymphe de quelques races d'Abeilles.
2e Coll. INRA de Biochimie, Maisons Alfort, 24 Janv. 1975 - 13p.

_______ 1975 - Les protéines de l'hémolymphe chez l'Abeille Apis mellifica, mellifica L. I - Larves, Nymphes et Adultes naissantes - Apidologie, 3, 12p.

_______ 1975 - Les protéines de l'hémolymphe chez l'Abeille Apis mellifica, mellifica L. II - Adultes butineuses et hivernantes Apidologie, 3, 14p.

_______ 1975 - Modifications d'activité des α glucosidases (E.C. 3-2-1-20) au cours de la nymphose chez l'Abeille C.R.Acad. Sc. (à paraître)

_______ 1975 - Les α-glucosidases et la glycémie chez l'Abeille noire, Apis mellifica, mellifica L. - Apimondia - 6p.

_______ 1975 - Analyse comparée des principales fractions protéiques de l'hémolymphe de différentes races d'Abeilles - Apimondia - 5p.

_______ 1975 - Modifications d'activité de quelques enzymes de l'hémolymphe au cours du développement chez l'Abeille noire, Apis mellifica, mellifica, L. - 3e Coll. de Physiol. des Insectes, Strasbourg 2 et 3 Mai 1975 - "Physiol. du Développt" - 4p.

Biochimie Végétale :

BOUNIAS, M. - 1975 - Modifications des relations quantitatives entre les pigments photosynthétiques et les acides aminés chez quelques mutants d'Orge et d'Arabidopsis
Can. J. Bot. (Biochem. Sections) 53 (8), 708-719

DEMANDES D'ACHAT

pour le

2e semestre 1975

INRA . Département de ZOOLOGIE
Laboratoire de Biochimie
Domaine Saint-Paul , 84140 Montfavet

Référence : B/75/18

DEMANDE D'ACHAT

BUDGET
- Année : 1975
- Catégorie : Fonct^t (Documentation)
- Source : Dépt. ZOOL.

Engagements Antérieurs : env. 70,00 F

Date : 11/8/75

Objet : Ouvrages Scientifiques

Motivation : Méthodes analytiques en biochimie

Fabricant ou Fournisseur : Voir : Editeurs

Adresse : LSTFE, 24 rue des Ecoles PARIS ou Documentation Internationale, Alfortville etc...

Désignation : Auteurs, et Titres	Références : Editeurs	Quantités	Prix
WOLF, F. J. 1969 - Separation methods in organic chemistry and biochemistry	ISBN 0-12-761650-0 Acad. Press	1	67,50
NAKANISHI, K. et al., 1974 - Natural Products chemistry - Vol. 1	ISBN 0-12.513901-2 Acad. Press	1	262,50
GANTER, P. et JOLLES, G. 1973 Histologie ~~[illegible]~~ tome 1	Gauthier Villars	1	188,00
Histo enzymologie tome 3	" "	1 est.	220,00
Hans Ulrich Bergmeyer Ed., 1974 Methods of Enzymatic analysis 4 volumes	Acad. Press and Verlag Chemie	4 vol.	990 F
	Total	HT	1728,00
		TVA	345,6
		TTC	2073,60

INRA . Département de ZOOLOGIE
Laboratoire de BIOCHIMIE
Domaine Saint-Paul , 84140 Montfavet

Référence : B/75/17

DEMANDE D'ACHAT

BUDGET
Année : 1975
Catégorie : Fonct^t
Source : Dépt Zool.

Date : 11/8/75

Engagements Antérieurs : 1898,76 F (matériel)

Objet : Microseringues de précision

Motivation : Gestion des volumes en micro analyse chromato-graphique et enzymologique. Compléments et remplacement de pièces hors d'usage.

Fabricant ou Fournisseur : Paul BLOCK et C^ie _ POLY-LABO

Adresse : 305 R^te de Colmar, 67 STRASBOURG MEINAU
(67023 Strasbourg Cedex) _
ou FLI _ Vitrolles

Désignation :	Références :	Quantités	Prix
Microseringue Hamilton 10µl pointe 3 à 90° pour pipetage	701 N	1	111,00
Microseringue Hamilton 25µl Standard	702 N	1	111,00
Micro seringue Hamilton 25µl pointe 3 à 90° pour pipetage	702 N	1	111,00
Micro seringue Hamilton 100µl pointe 3 à 90° pour pipetage	710	1	111,00
Micro seringue Hamilton 500µl pointe 3 à 90° pour pipetage et piston étanche téflon	1750	1	154,00
		Total	598,00
		TVA	119,6
		TTC	717,60

INRA . Département de ZOOLOGIE
Laboratoire de BIOCHIMIE
Domaine Saint-Paul , 84140 Montfavet

Référence : B/75/16

DEMANDE D'ACHAT

BUDGET
Année : 1975
Catégorie : Fonct^t
Source : Dépt 2001.

Date : 11/8/75

Engagements Antérieurs ... 1563,00

Objet : Plaquettes pour zymogrammes (Réactifs et matériel) (Produits) F

Motivation : Spectres enzymatiques chez l'Abeille et chez les noctuelles.

Fabricant ou Fournisseur : Laboratoires API

Adresse : La Balme les Grottes 38 390 Montalieu-Vercieu
Tél. la Balme 8 et 16 (Isère).

Désignation :	Références :	Quantités	Prix
Boites de 25 galeries API ZYM	2520	2	360,00
Coffrets de réactifs pour API ZYM	2521	2	28,00
		Total	388,00
		TVA	77,6
		TTC	465,60

INRA - Département de ZOOLOGIE
Laboratoire de BIOCHIMIE
Domaine Saint-Paul, 84140 Montfavet

Référence : B/75/15

DEMANDE D'ACHAT

BUDGET
Année : 1975
Catégorie : Fonct[t]
Source : Dept 200
Engag[ts] Ant[rs] : 1068,06 F (Produits)

Date : Juillet-Août 74 - 11/8/74

Objet : Réactifs et produits chimiques

Motivation : Electrophorèse sur plaques (Abeilles - Génét.) Réserve pour 2 mois de travail - + Etalons pour analyse des lipides. (Noctuelles - Miels)

Fabricant ou Fournisseur : Merck et BDH -

Adresse : Rég. Sud Est : ALLPHA-LABO 10, Traverse Aigle d'Or
13 100 Aix En Provence -

Désignation :	Références :	Quantités	Prix HT
Acrylamide	Merck 800830	500g	27,75
Méthylène NN' bis acrylamide	" 805968	250g	60,00
Dimethylamino Propionitrile	" 803224	250 ml	35,00
Glycine	" 500188	1 Kg	33,00
α Naphtyl acétate	" 12154	10g	28,25
(di) Sodium hydrogéno phosphate	" 4871	1 Kg	23,25
Potassium dihydrogéno phosphate	" 6573	1 Kg	13,20
Tris (hydroxyméthyl) amino methane	(" 8386)	(1 Kg)	(130,00)
ou	(BDH 27119)	(2×250g)	(≃ 50,00)
Glycérol Tri-oléate	BDH 41008	500 ml	22,00
Glycérol Tri-stéarate	BDH 41010	100g	45,00
	Total		417,45
		TVA	83,49
		TTC	500,94

INRA - Département de Zoologie
Laboratoire de biochimie

ANNÉE 1975

2e PROJET de CALENDRIER EXPERIMENTAL

JANVIER - Rédaction / Vérifications Protéines d'Abeilles - Analyse des Glucides : Techniques -

FEVRIER - Analyse des Glucides et des Ac. Aminés (Techniques) - Conclusions - 1er Manuscrit -
- Dépouillement des Travaux ASC/DHASC (carpocapses) au niveau des Glucides -
- Rédaction 1er rapport -

MARS - Dépouillement des Travaux ASC/DHASC au niveau des Ac. Aminés - Rapport -
- Déterm. Quantitative des protéines de l'hémolymphe de Noctuelles - Rapport -
- Protéines / Races d'Abeilles : fin de dépouillement et rédaction du manuscrit -

AVRIL - Achèvement Rédaction : Protéines/Races d'Abeilles - Analyse des hybrides et Dépouillement des comparaisons de la Fraction (F-1) chez les castes selon les saisons
- Enzymologie Abeille : effecteurs des α glucosidases : vérifications et rédaction -

MAI - Mise au point Techn. : Détermination des Glucides et Ac. Aminés des Pucerons
- Analyses préliminaires parallèles sur les Pêchers - Dépouillement - Rapport

JUIN - Suite : (Glucides des pucerons - + Glucides des coccinelles) à divers stades - Dépouillement des résultats
- [ébauche techn. et bibl. : Caroténoïdes du miel :]

JUILLET - Mise au pt techn. ; Analyse des lipides des noctuelles ... : essais de Déterminations quantitatives des diverses classes - CCM et Colonnes

AOUT - Congrès KYOTO - Mise en route C.P.G. sur les classes lipidiques séparées - Suite mises au pt CCM/Colonnes - puis C.P.G. -

SEPTEMBRE - Caroténoïdes du miel - lipides dans les coccinelles et pucerons (CCM) 1ers essais - Ethylène dans les pommes (C.P.G.) - Glucides et Ac. aminés des pêchers : variétés sensibles / Var. résistantes -

OCTOBRE Analyse biochimique des pucerons en fonction des traitements physiologiques et nutritionnels - Dépouillement - Glucides et lipides des oeufs d'Ephestia -

NOVEMBRE suite pucerons - 1er rapport - suite/oeufs d'Ephestia
Noctuelles : 1ers essais de Comparaison des races sédentaires et migratrices en ce qui concerne : Glucides - lipides - (Ac. Aminés) - Equipt enzymatique -

DECEMBRE Analyse des Glucides et lipides (et Ac. Aminés) des Noctuelles à divers stades éthologiques - Dépouillement et synthèse pour programmes 76 -

À Inclure en fonction des possibilités :

Protéines et Enzymes chez l'Abeille -
Rédaction / Sucres et Ac. Aminés de l'hémol. d'Abeilles à divers stades